



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
ANO 2013

**ISA SOFIA RIBEIRO
SALGADO**

**DETEÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES *JAK2* E *MPL*
POR *HIGH RESOLUTION MELTING***

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios electrónicos, quer de trabalhos académicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2013

**ISA SOFIA RIBEIRO
SALGADO**

**DETEÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES *JAK2* E *MPL*
POR *HIGH RESOLUTION MELTING***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Sérgio Manuel Madeira Jorge Castedo, Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e do Professor Doutor António Carlos Matias Correia, Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha irmã pelo incansável apoio.

o júri

presidente

Professor Doutor António José Arsénia Nogueira
Professor Associado com Agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente

Professor Doutor Fernando de Jesus Regateiro
Professor Catedrático, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

orientador

Professor Doutor Sérgio Manuel Madeira Jorge Castedo
Professor Associado, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

agradecimentos

Ao Professor Doutor Sérgio Castedo, o apoio e a orientação disponibilizados na realização desta dissertação. Agradeço ainda pela liberdade de ação que me permitiu, o que foi decisivo para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor António Carlos Matias Correia, a atenção e a disponibilidade na correção desta dissertação.

À Dr.^a Natália Salgueiro, o incentivo, a amizade, a dedicação e a ajuda sempre pronta.

Às minhas colegas de trabalho pela compreensão demonstrada, em especial à Dr.^a Cecília Correia, pela colaboração disponibilizada.

A todos os meus amigos pelo constante apoio moral, em particular à Ana e à Liliana pela amizade e pelo encorajamento constante.

Aos meus pais, por me incentivarem a lutar e por acreditarem em mim.

À minha irmã, a minha grande companheira nos bons e maus momentos, pela paciência e por nunca me deixar desistir.

Ao Bruno, pelo carinho, pelo apoio emocional e pelo companheirismo demonstrado nos momentos mais difíceis.

palavras-chave

Neoplasias mieloproliferativas (NMPs), policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (MFP), gene *JAK2*, gene *MPL*, mutação V617F-*JAK2*, *High Resolution Melting* (HRM).

resumo

As NMPs representam um grupo heterogêneo de doenças clonais caracterizadas pela expansão e produção excessiva de eritrócitos, granulócitos e/ou plaquetas sanguíneas na medula óssea. Em 2005, foi identificada a mutação V617F no gene *JAK2* numa elevada frequência de doentes com NMP, em especial nos doentes com PV (65-97%), TE (23-57%) e MFP (35-57%). A deteção da mutação V617F no gene *JAK2* e de outras mutações funcionalmente similares, isto é, mutações no exão 12 do gene *JAK2* e no exão 10 do gene *MPL*, foram recentemente incluídas pela Organização Mundial de Saúde, nos critérios de diagnóstico para a PV, TE e MFP.

Várias técnicas têm sido descritas e aplicadas à pesquisa destas mutações. A técnica de AS-PCR (PCR alelo-específico) é considerada uma técnica de diagnóstico capaz de detetar uma mutação heterozigótica presente em apenas 1-3% das células. Recentemente, o HRM foi descrito como uma técnica simples, rápida, de baixo custo e com elevada sensibilidade e especificidade na identificação e/ou deteção de mutações.

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a eficácia da técnica de HRM na deteção da mutação V617F-*JAK2*, das mutações no exão 12 do gene *JAK2* e do exão 10 do gene *MPL*, numa série de 160 amostras de doentes com diagnósticos de NMP. A técnica de HRM demonstrou uma especificidade de 100% e uma sensibilidade ligeiramente inferior (98,4%) na deteção da mutação V617F, quando comparada com a técnica utilizada por rotina no GDPN para a deteção desta mutação (AS-PCR). Na pesquisa de mutações no exão 12 do gene *JAK2* e exão 10 do gene *MPL*, a técnica de HRM permitiu detetar 100% dos casos com mutação.

Os resultados deste estudo sugerem que o HRM tem uma utilização limitada na deteção da mutação V617F do gene *JAK2*, embora se tenha revelado uma técnica adequada ao rastreio rápido das mutações do exão 12 do gene *JAK2* e do exão 10 do gene *MPL*. No presente estudo, foram detetadas mutações nos genes *JAK2* e *MPL* em 80,6% dos doentes com PV, em 32,0% dos doentes com TE, em 33,3% dos doentes com MFP e em 33,3% dos doentes com NMP não classificadas.

keywords

Myeloproliferative neoplasms (MPNs), polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), primary myelofibrosis (PMF), *JAK2* gene, *MPL* gene, *JAK2*-V617F mutation, High Resolution Melting (HRM).

abstract

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a heterogeneous group of clonal diseases characterized by increased and excessive proliferation of erythrocytes, granulocytes and/or platelets in the bone marrow. In 2005, several groups identified the presence of the V617F mutation in the *JAK2* gene in a significant proportion patients with PV (65-97%), ET (23-57%) and PMF (35-57%). Detection of the *JAK2* mutation or other functionally similar mutation, such as *JAK2* exon 12 mutations or *MPL* exon 10 mutations, have recently been included in the essential diagnostic criteria for PV, ET and PMF by the World Health Organization.

Several techniques have been used to detect these mutations. AS-PCR (allele specific PCR) is considered a diagnostic tool capable of detecting a heterozygous mutation present in only 1-3% of mutated cells. Recently, HRM was described as a simple, fast and cost effective technique with high sensitivity and specificity that allows the detection and identification of mutations.

The present study aimed at the evaluation of HRM as a diagnostic tool to detect *JAK2*-V617F, *JAK2* exon 12 mutations or *MPL* exon 10 mutations, in 160 samples of MPNs patients. HRM revealed a 100% specificity and a slightly lower sensitivity (98,4%) in the V617F mutation detection when compared to AS-PCR. HRM detected all positive cases with *JAK2* exon 12 mutations or *MPL* exon 10 mutations.

Our results suggest that HRM is of limited use to detect the *JAK2*-V617F mutation. However, it is a suitable technique for mutation screening of *JAK2* exon 12 mutations or *MPL* exon 10 mutations.

In this study, *JAK2* and *MPL* mutational frequency was 80,6% in PV, 32,0% in TE, 33,3% in PMF and in unclassifiable MPNs patients.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABELAS	ii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	iii

INTRODUÇÃO	1
1. HEMATOPOIESE	2
1.1. Regulação da hematopoiese	3
1.1.1. Via de sinalização JAK-STAT	4
1.1.2. As proteínas JAK	5
2. CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS	7
3. EPIDEMIOLOGIA DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS	9
4. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA PV, TE E MFP	10
4.1. Características clínico-patológicas	10
4.1.1. Policitemia Vera (PV)	10
4.1.2. Trombocitemia essencial (TE)	12
4.1.3. Mielofibrose Primária (MFP)	13
4.2. Características genéticas	15
4.2.1. Mutações no gene <i>JAK2</i>	17
4.2.1.1. A mutação V617F	17
4.2.1.2. Mutações no exão 12	19
4.2.2. Mutações no gene <i>MPL</i>	20
4.3. Diagnóstico diferencial	22
5. TRATAMENTO DA PV, TE E MFP	23
5.1. Inibidores de JAK2	25
6. TÉCNICAS MOLECULARES DE DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES DOS GENES <i>JAK2</i> E <i>MPL</i>	26
6.1. PCR Alelo-Específico (AS-PCR)	27
6.2. <i>High Resolution Melting</i>	28
OBJETIVOS	29

MATERIAL E MÉTODOS	31
1. MATERIAL	32
2. MÉTODOS	33
2.1. Processamento das amostras de sangue periférico	33
2.2. Extração de DNA	33
2.3. Pesquisa da mutação V617F no gene <i>JAK2</i> por PCR	
Alelo-Específico (AS-PCR)	34
2.3.1. Reação em cadeia da polimerase	34
2.3.2. Eletroforese em gel de agarose	35
2.4. Pesquisa das mutações V617F, exão 12 do gene <i>JAK2</i>	
e exão 10 do gene <i>MPL</i> por High Resolution Melting (HRM)	36
2.5. Sequenciação do exão 12 do gene <i>JAK2</i> e exão 10 do gene <i>MPL</i>	37
2.5.1. Purificação dos produtos de PCR	37
2.5.2. Reação de sequenciação	38
2.6. Quantificação da mutação V617F do gene <i>JAK2</i> por PCR	
em tempo real	39
 RESULTADOS	 40
1. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE HRM E AS-PCR NA DETECÇÃO	
DA MUTAÇÃO V617F NO GENE <i>JAK2</i>	42
2. ANÁLISE DA TÉCNICA DE HRM NA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO	
EXÃO 12 DO GENE <i>JAK2</i>	44
3. ANÁLISE DA TÉCNICA DE HRM NA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO	
EXÃO 10 DO GENE <i>MPL</i>	46
4. FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE <i>JAK2</i> E <i>MPL</i> NOS DOENTES	
COM PV, TE, MFP E NMP NÃO CLASSIFICADA	48
 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	 50
1. CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS	51
2. FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES NO GENE <i>JAK2</i> E <i>MPL</i>	
NAS NMP CLÁSSICAS BCR-ABL1 NEGATIVAS	55
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 58
 ANEXOS	 65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Hematopoiese	3
Figura 2 – Via de sinalização JAK-STAT	5
Figura 3 – Estrutura das proteínas JAK	6
Figura 4 – Mutações no exão 12 do gene <i>JAK2</i>	20
Figura 5 – Esquema do AS-PCR para a detecção da mutação V617F	28
Figura 6 – Resultados da análise da mutação V617F do gene <i>JAK2</i> por HRM	43
Figura 7 – Resultados da análise do exão 12 do gene <i>JAK2</i>	45
Figura 8 – Resultados da análise do exão 10 do gene <i>MPL</i>	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das neoplasias mielóides da OMS de 2008	8
Tabela 2 – Critérios de diagnóstico para PV	11
Tabela 3 – Critérios de diagnóstico para TE	13
Tabela 4 – Critérios de diagnóstico para MFP	15
Tabela 5 – Mutações nos genes <i>JAK2</i> e <i>MPL</i> na PV, TE e MFP	23
Tabela 6 – Tratamento e grupos de risco dos doentes com PV e TE	24
Tabela 7 – Sensibilidade das técnicas moleculares para a deteção da mutação V617F	27
Tabela 8 – Programas de PCR por HRM	36
Tabela 9 – Sequências dos primers utilizados	37
Tabela 10 – Diagnósticos clínicos/Achados clínicos dos doentes com suspeita de NMP e respetivos resultados da pesquisa de mutações nos genes <i>JAK2</i> e <i>MPL</i>	41
Tabela 11 – Amostras com padrão alterado na pesquisa de mutações no exão 12 do gene <i>JAK2</i> por HRM	44
Tabela 12 – Amostras com padrão alterado na pesquisa de mutações no exão 10 do gene <i>MPL</i> por HRM	46

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Sensibilidade e especificidade do HRM na deteção da mutação V617F (comparação com a técnica de AS-PCR)	42
Gráfico 2 – Frequência de mutações nos doentes com PV e com TE	48
Gráfico 3 – Frequência de mutações nos doentes com poliglobulia e/ou eritrocitose, trombocitose e NMP não classificada	49

LISTA DE ABREVIATURAS

(ordenadas alfabeticamente)

ABL: *c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase*

ARMS: *amplification refractory mutation system*

AS-PCR: PCR alelo específico (*allele specific PCR*)

BCR: *breakpoint cluster region*

BCSH: *British Committee for Standards in Haematology*

bp: par de base (*base pair*)

C: citosina

CFS: fatores estimuladores de colónias

Del: deleção

dHPLC: *denaturing high-performance liquid chromatography*

DIPSS: *Dynamic International Prognostic Scoring System*

DMPC: Doença Mieloproliferativa Crónica

DNA: ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

dNTP's: desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EPO: eritropoietina

EUA: Estados Unidos da América

FDA: *Food and Drug Administration*

G: guanina

HRM: *high resolution melting*

IL: interleucinas

IPSS: *International Prognostic Scoring System*

JAK: *Janus Kinase*

JH: *JAK homology*

LMC: leucemia mieloide crónica

LOH: perda da heterozigotia (*loss of heterozygosity*)

MFP: mielofibrose primária

MO: medula óssea

MPL: *myeloproliferative leukemia virus oncogene*

NAACCR: *North American Association of Cancer Registries*

NK: *natural killer*

NMP: Neoplasia Mieloproliferativa

OMS: Organização Mundial de Saúde

p: braço curto do cromossoma

PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PCR-RFLP: *restriction fragments length polymorphism*

PV: policitemia vera

q: braço longo do cromossoma

RORENO: Registo Oncológico da Região Norte

SEER: *Surveillance, Epidemiology and End Results*

SH2: *Src-homology 2*

SMD: Síndrome Mielodisplásica

SMP: Síndrome Mieloproliferativa

STAT: *signal transducer and activator of transcriptional proteins*

TBE: Tris-borato-EDTA

TE: trombocitemia essencial

TPO: trombopoietina

INTRODUÇÃO

As neoplasias mieloproliferativas (NMPs) representam um grupo heterogêneo de doenças clonais que têm origem em células hematopoiéticas indiferenciadas e que se caracterizam por distintos fenótipos clínicos e citomorfológicos e, em certos casos, por características genéticas associadas. São caracterizadas pela expansão e produção excessiva de eritrócitos, granulócitos e/ou plaquetas na medula óssea, associadas a um aumento dos parâmetros no sangue periférico (Kim *et al*, 2013).

1. HEMATOPOIESE

A hematopoiese é um processo biológico através do qual se dá a produção de vários tipos de células sanguíneas, com funções que variam desde o transporte de oxigênio à imunidade (figura 1) (Fey, 2007).

A formação e desenvolvimento das células hematopoiéticas ocorrem na medula óssea e é iniciado por células hematopoiéticas indiferenciadas, células com capacidade de se dividirem indefinidamente e de se diferenciarem em células progenitoras para todas as linhas hematopoiéticas. As células progenitoras, por sua vez, perdem a capacidade de se auto-multiplicarem e diferenciam-se em células da linha mielóide ou linfóide. Os progenitores mielóides diferenciam-se progressivamente e originam células maduras funcionais, nomeadamente, eritrócitos, megacariócitos/plaquetas, monócitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. As células maduras que se originam das células progenitoras linfóides incluem linfócitos B, T ou células *natural killer* (NK) (Koopmans *et al*, 2012).

A representatividade dos diferentes tipos de células no sangue periférico depende de diversos fatores, intrínsecos e extrínsecos, alterando-se drasticamente em situações como infeções ou hemorragias, voltando progressivamente aos níveis normais quando o factor de stresse desaparece. Estas observações indicam que a produção e diferenciação das células hematopoiéticas indiferenciadas resultam de mecanismos de regulação que

mantêm a produção das diversas células hematopoiéticas equilibrada (Hoang, 2004).

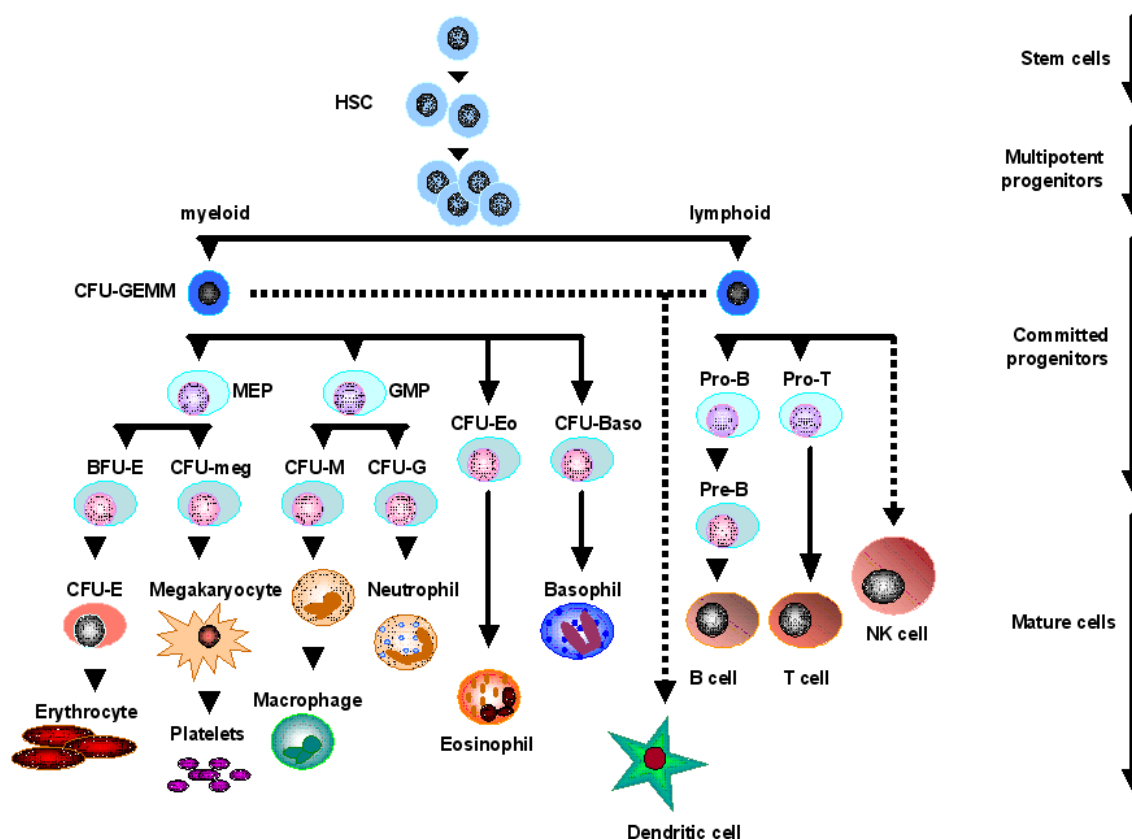


Figura 1 – Hematopoiese.

HSC – Células hematopoiéticas indiferenciadas; CFU-GEMM - Progenitor mielóide; MEP- Progenitor de megacariócitos/eritrócitos; GMP – Progenitor de granulócitos/macrófagos. (Adaptado de *The role of Smad signaling in hematopoiesis*, Jonas Larsson and Stefan Karlsson, 2005)

1.1.Regulação da hematopoiese

O crescimento e a diferenciação das células hematopoiéticas são regulados por um grupo de fatores de crescimento hematopoiéticos ou citocinas (Hunter, 1993). As citocinas constituem uma família de ligandos específicos extracelulares que estimulam respostas biológicas em diversos tipos celulares através da sua ligação a recetores de citocinas estrutural e funcionalmente conservados. Para

todas as citocinas existem recetores específicos, os recetores de citocinas ou recetores hematopoiéticos, presentes nas membranas celulares das células hematopoiéticas. As citocinas comuns envolvidas na hematopoiese normal incluem as interleucinas (ILs), fatores estimuladores de colónias (CFS), interferões, eritropoietina (EPO) e trombopoietina (TPO) (Robb, 2007).

1.1.1. Via de sinalização JAK-STAT

A via de sinalização JAK-STAT é um dos principais mecanismos de transmissão de sinais induzidos por citocinas ou fatores de crescimento em processos de desenvolvimento e de homeostase, tais como, a estimulação da proliferação celular, diferenciação, migração celular e apoptose, em eventos como a hematopoiese, o desenvolvimento do sistema imunológico, a manutenção das células hematopoiéticas indiferenciadas, a lactação, a fertilidade e a embriogénese (Rawlings *et al*, 2004).

As proteínas JAK são intermediárias entre a transmissão do sinal extracelular provocado pela ligação das citocinas aos seus recetores e as moléculas de sinalização que promovem a resposta transcripcional. A ligação das citocinas ou fatores de crescimento aos seus recetores provocam a dimerização ou oligomerização destes últimos que, por sua vez, provocam a ligação das moléculas JAK. O recrutamento das proteínas JAK resulta na sua autofosforilação ou transfosforilação por outras proteínas JAK ou por outras famílias de tirosinas cinases, tornando a sua atividade de cinase ativa. As proteínas JAK, quando activas, fosforilam o domínio citoplasmático do recetor de citocinas criando locais de ligação para determinados fatores de transcrição, tais como as moléculas STAT (*signal transducer and activator of transcription proteins*). As STATs fosforiladas entram no núcleo e ligam-se a sequências regulatórias específicas para ativar ou reprimir a transcrição de genes específicos (figura 2) (Jatiani *et al*, 2010 e Furgan *et al*, 2013).

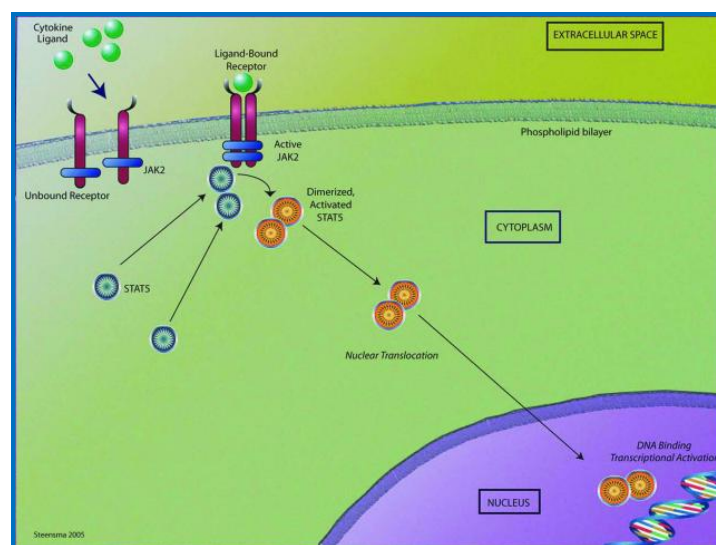


Figura 2 – Via de sinalização JAK-STAT. (Adaptado de *Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application*, Furgan et al, 2013).

1.1.2. As proteínas JAK

As proteínas JAK (*Janus Kinase*) são tirosinas cinases citoplasmáticas que compreendem uma família de quatro membros: JAK1, JAK2, JAK3 e TK2 (tirosina cinase 2). Embora cada membro das proteínas JAK possua uma função específica, a sua estrutura é semelhante e composta por sete domínios JH (JAK *homology*) distribuídos em quatro regiões (figura 3):

- o domínio de cinase ativo, JH1, tem como função a fosforilação das proteínas alvo, sendo assim responsável pela propagação de sinal;
- o domínio de pseudocinase, JH2, é um domínio cataliticamente inativo com função de inibição da atividade basal do domínio de cinase. Embora seja composto na sua maioria por resíduos de aminoácidos conservados característicos das cinases funcionais, o domínio JH2 perde a sua atividade de tirosina cinase, devido à ausência de resíduos necessários para a atividade catalítica. Contudo, este domínio é crítico na regulação da atividade da proteína JAK2 (Baker et al, 2007);
- o domínio FERM (N-terminal) é composto pelos domínios JH7, JH6, JH5 e parte do JH4 e é responsável pelas ligações não covalentes aos recetores de citocinas;

- e o domínio SH2 (*Src-homology 2*) composto pelos domínios JH3 e parte do JH4. Embora a função deste domínio ainda não seja clara, alguns estudos sugerem que este domínio não funcione como os domínios SH2 tradicionais de outras proteínas, pelo facto de não se ligarem a resíduos de fosfotirosina como os seus homólogos (Ghoreschi *et al*, 2009 e Jatiani *et al*, 2010).

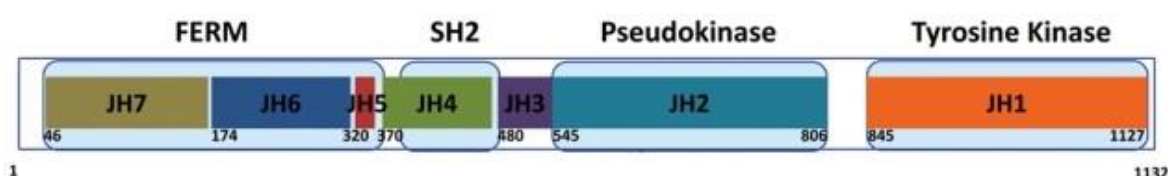


Figura 3 – Estrutura das proteínas JAK
(Adaptado de Jatiani *et al*, 2010)

A desregulação na via de sinalização JAK-STAT tem sido associada ao início e progressão de várias neoplasias hematológicas, especialmente em doenças mieloproliferativas (Furgan *et al*, 2013). Mutações nos genes codificadores de proteínas JAKs têm sido detetadas em diferentes tipos de neoplasias hematopoiéticas e em tumores sólidos (Ghoreschi *et al*, 2009). Em 2005, foi publicado pela primeira vez uma mutação no gene que codifica para a proteína JAK2 em doentes com Neoplasias Mieloproliferativas, demonstrando a importância destas proteínas particularmente em doenças como a policitemia vera, trombocitemia essencial e a mielofibrose primária (Baxter *et al*, 2005, James *et al*, 2005, Kralovic *et al*, 2005 e Levine *et al*, 2005).

2. CLASSIFICAÇÃO DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Em 1951, William Dameshek criou o conceito dos Síndromes Mieloproliferativos (SMP) com o intuito de enfatizar a forte semelhança clínica e patológica que existia entre a leucemia mielóide crónica (LMC), a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e a mielofibrose primária (MFP) (Dameshek, 1951).

Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reformulou o sistema de classificação dos tumores hematopoiéticos e dos tecidos linfóides na tentativa de aperfeiçoar os seus critérios de diagnóstico e melhorar a definição dos prognósticos. Foi introduzido o grupo das Doenças Mieloproliferativas Crónicas (DMPC) como um subgrupo das neoplasias mielóides, que passou a incluir para além das SMP, outras patologias com menor incidência, nomeadamente, a leucemia neutrofílica crónica, a leucemia eosinofílica crónica ou síndrome hipereosinofílica e as doenças mieloproliferativas crónicas não classificáveis (Vardiman *et al*, 2002).

Em 2008, a OMS, substituiu o grupo das DMPC pela atual designação de Neoplasias Mieloproliferativas (NMP), com o intuito de sublinhar a natureza neoplásica das doenças mieloproliferativas. A inclusão da mastocitose, bem como a separação da leucemia eosinofílica crónica da síndrome hipereosinofílica em duas subcategorias distintas, constituíram outras atualizações do sistema de classificação das NMP (Swerdlow *et al*, 2008).

Assim, atualmente, a OMS classifica as NMP como um grupo de neoplasias mielóides que incluiu oito entidades (tabela 1): LMC, PV, TE, MFP, leucemia neutrofílica crónica, leucemia eosinofílica crónica, mastocitose e doenças mieloproliferativas crónicas não classificáveis (Swerdlow *et al*, 2008). De entre estas entidades, a LMC, PV, TE e MFP são correntemente referidas como as NMP “clássicas”, por terem sido descritas inicialmente no grupo dos Síndromes Mieloproliferativos (SMP).

Tabela 1 – Classificação das neoplasias mielóides da OMS de 2008

(Adaptado de Tefferi, 2012)

Neoplasias Mielóides	Subtipos
Neoplasias mieloproliferativas (MPN)	<u>Clássicas</u> Leucemia mielóide crónica – BCR/ABL+ Policitemia vera Trombocitemia essencial Mielofibrose primária <u>Não clássicas</u> Leucemia neutrofílica crónica Leucemia eosinofílica crónica Mastocitose NMP não classificáveis
Síndromes mielodisplásicas (SMD)	Citopenia refratária com displasia unilinhagem Anemia refratária com sideroblastos em anel Citopenia refratária com displasia multilinhagem Anemia refratária com excesso de blastos SMD associado à deleção 5q- isolada SMD não classificável
SMD/NMP	Leucemia mielomonocítica crónica Leucemia mielomonocítica juvenil Leucemia mielóide crónica atípica SMD/NMP não classificáveis (Anemia refratária com sideroblastos em anel com marcada trombocitose)
Neoplasias mielóides e linfóides associadas a eosinófilia e anomalias do PDGFRA, PDGFRB ou FGFR1	Neoplasias mielóides associadas ao rearranjo PDGFRA Neoplasias mielóides associadas ao rearranjo PDGFRB Neoplasias mielóides associadas ao rearranjo FGFR1 (síndrome mieloproliferativa 8p11)
Leucemia aguda mieloblástica (LAM)	

3. EPIDEMIOLOGIA DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

As NMP “clássicas” estão entre as neoplasias hematológicas mais frequentes e são fundamentalmente, neoplasias do adulto, embora também possam ocorrer em crianças (Vannucchi *et al*, 2009).

A incidência das NMP varia com a idade, sexo e raça. De acordo com os dados do programa *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) e do *North American Association of Cancer Registries* (NAACCR), entre 2001 e 2003, a taxa de incidência de NMP nos Estados Unidos da América (EUA) é de cerca de 2,1 novos casos por 100.000 habitantes por ano. O risco de NMP aumenta com a idade, tendo sido aproximadamente 83% dos casos de NMP diagnosticados em indivíduos com mais de 50 anos de idade. A taxa de incidência é significativamente maior nos homens do que nas mulheres (2,54 vs. 1,80 por 100.000 habitantes por ano). Considerando os grupos raciais, a taxa de incidência de NMP é mais elevada nos indivíduos caucasianos (Rollison *et al.*, 2008; Swerdlow *et al*, 2008).

Em Portugal, segundo dados do Registo Oncológico da Região Norte (RORENO), no ano 2008 a taxa de incidência das Doenças Mieloproliferativas Crónicas foi de 1,9 novos casos por 100.000 habitantes por ano (1,8 no sexo masculino vs. 2,0 no sexo feminino). A taxa de incidência mais elevada foi observada no grupo etário dos 75 - 79 anos (10,1 novos casos por 100.000 habitantes por ano). De acordo com dados do registo oncológico nacional, em 2001 a taxa de incidência das Doenças Mieloproliferativas Crónicas foi de 1,2 novos casos por 100 000 habitantes por ano.

As causas da maioria das NMP são desconhecidas. No entanto, alguns fatores de risco têm sido associados a pacientes que desenvolveram PV ou MFP, tais como exposição a agentes químicos nocivos (toxinas e benzeno) e a radiações ionizantes. Recentemente, diversos estudos têm sugerido um papel dos fatores hereditários na etiologia das NMP (Swerdlow *et al*, 2008 e Kristinsson *et al*, 2010).

4. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA PV, TE E MFP

O diagnóstico das NMP é baseado numa abordagem clínico-patológica multidisciplinar que integra as características clínicas do paciente, a análise morfológica das células da medula óssea e sangue periférico e estudos laboratoriais, tais como, estudos citoquímicos e de imunofenotipagem, e estudos das alterações genéticas ou citogenéticas (Tefferi *et al*, 2011).

4.1. Características clínico-patológicas

As NMP caracterizam-se essencialmente por um aumento na proliferação de um ou mais componentes da linha mielóide da medula óssea. A hipercelularidade da medula óssea com maturação eficaz e consequente leucocitose, eritrócitose ou trombocitose no sangue periférico constituem as principais características clínicas das NMP. Frequentemente, os doentes apresentam esplenomegalia e hepatomegalia devido ao excesso de células sanguíneas resultantes da sua proliferação anormal. Algumas NMP progridem para fibrose medular ou leucemia (Swerdlow *et al*, 2008).

4.1.1. Policitemia Vera (PV)

A policitemia vera é caracterizada pelo aumento da proliferação de eritrócitos, independentemente dos mecanismos que regulam a eritropoiese (Spivak, 2002). O aumento da massa eritrocitária causa uma variedade de sintomas, sendo os mais comuns, eventos trombóticos, esplenomegalia, hipertensão, prurido, eritromelalgia, gota, úlceras, cefaleias, tonturas, distúrbios visuais e parestesias (Finazzi e Barbui, 2007; Swerdlow *et al*, 2008).

A doença desenvolve-se em três fases: fase inicial ou pré-policitémica, caracterizada por eritrocitose ligeira; fase policitémica, caracterizada por um

aumento significativo da massa eritrócitária; e, fase pós-policitémica caracterizada pelo aparecimento de fibrose medular, anemia e aumento acentuado do baço (Finazzi e Barbui, 2007; Swerdlow *et al*, 2008).

Os fatores de risco associados a uma sobrevida baixa dos pacientes com PV incluem história clínica de trombose, leucocitose e idade superior a 60 anos de idade. A sobrevida média é de cerca de 9 anos para os pacientes com idade avançada e com leucocitose, podendo alcançar os 23 anos nos doentes com ausência destes fatores de risco (Tefferi (a), 2013). A predisposição dos pacientes para desenvolver complicações trombóticas ou hemorrágicas, a evolução da doença para fibrose medular, mielodisplasia ou para leucemia aguda, representam as maiores causas de morbidade e mortalidade na PV (Finazzi e Barbui, 2007).

Em 2008, a OMS definiu os critérios de diagnóstico para a PV, referindo a necessidade da presença dos dois critérios *major* e de um critério *minor* ou do primeiro critério *major* e dois *minor*, referidos na tabela 2, para o diagnóstico desta patologia. É de salientar que todas as causas de eritrocitose secundária, policitemia hereditária e outras NMP devem ser excluídas (Swerdlow *et al*, 2008).

Tabela 2 – Critérios de diagnóstico para PV

Critérios major

1. Hemoglobina >18.5 g/dl nos homens e > 16.5 g/dl nas mulheres ou outras evidências de aumento do volume de eritrócitos
2. Presença da mutação V617F *JAK2* ou outras mutações funcionalmente similares (mutações no exão 12 do gene *JAK2*)

Critérios minor

1. MO hipercelular com proliferação proeminente da linha eritroide, granulocítica e megacariocítica
2. Eritropoietina sérica (EPO) abaixo dos valores de referência;
3. Formação *in vitro* de colónias de eritrócitos

(Adaptado de Swerdlow *et al*, 2008)

4.1.2. Trombocitemia Essencial (TE)

A trombocitemia essencial caracteriza-se pela excessiva proliferação de megacariócitos na medula óssea e pela acumulação persistente de plaquetas no sangue periférico. As principais manifestações clínicas são as trombozes e hemorragias associadas a cefaleias, tonturas e distúrbios visuais (Tefferi e Barbui, 2005).

Uma grande proporção de doentes com TE (mais de 50%) mantém-se assintomática durante longos períodos, surgindo ocasionalmente episódios graves de tromboembolismos ou hemorragias. Alguns doentes podem desenvolver mielofibrose (<10%) ou progredir para leucemia aguda mielóide (2%), síndrome mielodisplásica (SMD) ou policitemia vera (Campbell *et al*, 2005; Koopmans *et al*, 2012).

Tal como nos pacientes com PV, a existência de história clínica de trombose, leucocitose e idade avançada constituem os fatores de risco associados a uma sobrevida baixa dos pacientes com TE. A sobrevida média é de cerca de 9 anos nos pacientes com presença de pelo menos dois destes fatores de risco e de cerca de 20 anos na ausência dos três fatores de risco mencionados. De uma forma geral, a esperança média de vida destes pacientes é semelhante à da população normal, uma vez que a maioria destes doentes (cerca de 80%) apresenta um tempo de sobrevida superior a 15 anos (Tefferi (a), 2013).

É necessário o cumprimento dos quatro critérios definidos pela OMS para o diagnóstico de TE (tabela 3) de forma a excluir outras causas de trombocitose (trombocitose reativa), tais como outras NMP, doenças inflamatórias e infecciosas, hemorragias, resposta a exercício, reações a medicamentos e outros tipos de neoplasia hematopoiética e não hematopoiética (Chauffaille, 2010).

Tabela 3 – Critérios de diagnóstico para TE

1. Contagem de plaquetas $\geq 450 \times 10^9/L$
2. Medula óssea com proliferação principal da linhagem megacariocítica, com megacariócitos maduros aumentados em número e em tamanho. Nenhuma ou pouca proliferação de granulócitos ou eritrócitos
3. Ausência de critérios da OMS para PV, MFP, LMC BCR-ABL1+, SMD ou outra neoplasia mielóide
4. Presença da mutação V617F *JAK2* ou outro marcador clonal, ou, na sua ausência, nenhuma evidência de trombocitose reativa

(Adaptado de Swerdlow *et al*, 2008)

4.1.3. Mielofibrose Primária (MFP)

A mielofibrose primária, também designada por mielofibrose idiopática crónica ou mielofibrose com metaplasia mielóide, é caracterizada por uma acumulação de tecido fibroso na medula óssea, resultante da proliferação excessiva de megacariócitos e granulócitos. A deposição de reticulina e colagénio nos espaços extracelulares da medula óssea (mielofibrose) impede a proliferação normal de células hematopoiéticas, levando à entrada das células hematopoiéticas indiferenciadas na circulação e uma consequente hematopoiese extramedular que ocorre preferencialmente no baço e fígado (Swerdlow *et al*, 2008).

O fenótipo clínico inclui essencialmente uma anemia progressiva, hepatoesplenomegalia, caquexia, dor óssea, enfarte do baço, prurido, trombozes, hemorragias e outros sintomas, como fadiga, sudorese noturna e febre (Tefferi (b), 2013).

O tempo de sobrevida destes doentes pode variar de entre 1 a 15 anos, dependendo do grupo de risco em que se encontram (baixo, intermédio e alto risco). De acordo com o IPSS (*International Prognostic Scoring System*) e o DIPSS (*Dynamic International Prognostic Scoring System*) são considerados oito factores como adversos a um bom prognóstico: idade superior a 65 anos, hemoglobina inferior a 10g/dL, leucócitos superiores a $25 \times 10^9/L$, blastos circulantes superiores a 1%, plaquetas inferiores a $100 \times 10^6/L$, cariótipo anormal,

presença de sintomas constitucionais e necessidade de transfusões sanguíneas. A progressão para leucemia (cerca de 20%), eventos cardiovasculares, infecções e hemorragias estão entre as maiores causas de morbidade e mortalidade na MFP (Tefferi (b), 2013).

A mielofibrose pode apresentar-se como uma doença de novo (MFP) ou desenvolver-se num quadro clínico de PV (fase pós-policitémica com mielofibrose) ou TE (fase pós-trombocitémica com mielofibrose) (Brien *et al*, 2004).

Segundo a OMS, é necessário o preenchimento dos 3 critérios *major* e de 2 critérios *minor* para a confirmação diagnóstica de MFP (ver tabela 4). De salientar que a fibrose medular também é uma consequência reativa verificada em diversas patologias, tais como outras NMP (LMC, PV, TE e NMP não classificável), tricoleucemia ou outras neoplasias linfóides, doenças miéloides do grupo das SMD/NMP, SMD com fibrose, leucemia megacariocítica aguda, leucemias agudas com fibrose e outras neoplasias não hematológicas metastizadas para a medula. A fibrose na medula óssea também pode ocorrer como evento secundário a outras patologias tais como, tuberculose e histoplasmoses, doenças inflamatórias, lúpus eritematoso sistémico, hipertensão pulmonar, hiperparatiroidismo e hipoparatiroidismo (Swerdlow *et al*, 2008; Chauffaille, 2010).

Tabela 4 – Critérios de diagnóstico para MFP*Critérios major*

1. Presença de proliferação megacariocítica e atipia, usualmente acompanhada por fibrose reticulínica e/ou fibrose colagénica
Ou, na ausência de fibrose reticulínica significativa, as alterações megacariocíticas devem ser acompanhadas por aumento na celularidade da medula óssea caracterizada por proliferação granulocítica com diminuição de eritropoiese
2. Ausência de critérios da OMS para PV, LMC BCR/ABL1+, SMD ou outra neoplasia mielóide
3. Presença da mutação V617F *JAK2* ou outro marcador clonal ou na sua ausência, nenhuma evidência de fibrose medular reativa

Critérios minor

1. Leucoeritroblastose
2. Aumento do nível sérico de desidrogenase láctica (DHL)
3. Anemia
4. Esplenomegalia

(Adaptado de Swerdlow *et al*, 2008)

4.2. Características genéticas

Em 2001, a OMS incluiu as alterações genéticas como critério de classificação das várias entidades das MPN (Vardiman *et al*, 2002).

Os primeiros desenvolvimentos na compreensão da patogenicidade das NMP começaram em 1960, quando *Nowell* e *Hungerford* descobriram o cromossoma Filadélfia (Ph) em pacientes com LMC. Mais tarde, esta alteração foi caracterizada como resultante de uma translocação recíproca [t(9;22)(q34;q11)] que envolve o gene *ABL1* do cromossoma 9 e o gene *BCR* do cromossoma 22 originando um gene de fusão (*BCR-ABL1*) (Groffen *et al*, 1984). A proteína resultante deste gene de fusão tem actividade de tirosina cinase e tem sido o alvo de terapias dirigidas para o tratamento das LMC (inibidores de tirosina cinase). A presença do gene de fusão *BCR-ABL1* é típica da LMC (embora também possa ocorrer em leucemias mieloblásticas agudas e em leucemias linfocíticas agudas)

e a sua exclusão é essencial para o diagnóstico de outras NMP (Tefferi *et al*, 2009). Deste facto advém a criação do termo “NMP clássicas *BCR-ABL1* negativas” que integra a PV, TE e MFP (Tefferi, *et al* 2010).

Até 2005, os critérios de diagnóstico estabelecidos para a PV, TE e MFP, eram baseados principalmente em características clínicas e morfológicas. O facto de não existirem, até então, características morfológicas ou genéticas específicas destas NMP clássicas, dificultava a sua distinção de condições reativas da medula óssea (Olsen *et al*, 2006). Os testes que existiam para a confirmação destes diagnósticos clínicos, para além de dispendiosos e pouco disponíveis, careciam de sensibilidade e especificidade (determinação da massa de eritrócitos, identificação de colónias de eritrócitos *in vitro* independentes da eritropoietina, análise citogenética das células da medula óssea, determinação dos níveis de eritropoietina, ecografias do baço e testes para a expressão aumentada de policitemia vera) (Campbell e Green, 2006). As anomalias citogenéticas descritas, ao contrário das LMC, não são específicas destas patologias e ocorrem apenas em cerca de 33% dos pacientes com MFP, 11% na PV e em 7% na TE. As mais comuns incluem deleções no braço longo do cromossoma 20 e do cromossoma 13 [del(20q), del(13q)] e trissomias dos cromossomas 8 e 9 (Tefferi *et al*, 2009).

A descoberta de mutações no gene *JAK2* e no gene *MPL* numa proporção significativa de pacientes com PV, TE e MFP foram cruciais na compreensão da patogénese molecular destas doenças. Tais mutações conferem um aumento de atividade das respetivas proteínas devido à ativação constitutiva das tirosinas cinases, independentemente da sua activação por fatores de crescimento (Vannucchi *et al*, 2009).

Atualmente, estas mutações são utilizadas como marcadores moleculares no diagnóstico das NMP clássicas *BCR-ABL* negativas (Kim *et al*, 2013).

4.2.1. Mutações no gene *JAK2*

Os estudos sobre a patogénese molecular da PV sugeriram uma alteração das vias de sinalização, o qual levará à eritrocitose autónoma. Em 1974, uma experiência crítica demonstrou que os precursores de eritrócitos retirados da medula óssea de doentes com PV possuíam a capacidade de proliferar *in vitro* na ausência de um fator de crescimento de eritrócitos exógeno (Prchal *et al*, 1974). Esta característica também foi demonstrada mais tarde numa proporção significativa de doentes com TE e MFP mas nunca em indivíduos saudáveis. Embora, estas observações sugerissem uma anomalia no recetor de eritrócitos, ficou provado que o recetor de eritropoietina (EPO) se encontrava normal nos doentes com PV, TE e MFP, à exceção de casos com eritrocitose familiar (Kaushansky, 2005). Estas observações constituíram o ponto de partida para a investigação do papel das proteínas da família JAK na PV, TE e MFP.

A sequenciação completa do gene *JAK2* do sangue periférico humano foi fundamental para a identificação de mutações responsáveis pela perda de atividade da proteína produzida e pelo consequente aparecimento de muitas das características associadas às neoplasias mieloproliferativas. O gene *JAK2* está localizado em 9p24, é constituído por 25 exões e codifica para uma proteína de 1132 aminoácidos.

4.2.1.1. A mutação V617F

A primeira associação da mutação V617F no gene *JAK2* com as NMP foi descrita em 2005, por quatro grupos independentes, que detetaram esta mutação na maioria dos pacientes com PV (65-97%) e em cerca de metade dos pacientes com TE (23-57%) e MFP (35-57%) (Baxter *et al*, 2005, James *et al*, 2005, Kralovic *et al*, 2005 e Levine *et al*, 2005).

Desde então, esta mutação tem sido descrita, embora numa frequência mais baixa, em outras NMP, como a leucemia neutrofílica crónica e em outras neoplasias mielóides, tais como os casos de anemia refratária com sideroblastos

em anel com marcada trombocitose (20-50%), em síndromes mielodisplásicas (<5%) e em leucemias mielóides agudas (<5%). Esta mutação é raramente encontrada em neoplasias não mielóides ou em tumores sólidos. (Tefferi *et al*, 2009).

A mutação V617F consiste na substituição de uma guanina por uma timina no nucleótido 1849 do exão 14 do gene *JAK2* (c.1849G>T). Esta mutação provoca a substituição do aminoácido conservado valina pelo aminoácido fenilalanina no codão 617 (p.V617F) situado no domínio de pseudocinase JH2 da proteína JAK2 (Tefferi, 2010). Esta alteração anula a função inibitória do domínio não catalítico JH2 sobre o domínio JH1, induzindo uma conformação estrutural no domínio JH1 que lhe permite a fosforilação por outras moléculas JAK2 mutantes. Como resultado, as proteínas JAK2 mutadas tornam-se constitutivamente ativas, mimetizando um fator de crescimento hematopoiético contínuo e provocando a desregulação da via de sinalização JAK-STAT (Qian *et al*, 2010).

A mutação V617F é uma alteração somática confinada aos compartimentos hematopoiéticos, não estando presente, na maioria dos pacientes, na linha germinativa (Levine e Gilliland, 2008).

A mutação V617F ocorre tanto num padrão heterozigótico (num dos alelos) como homozigótico (em ambos os alelos). O desenvolvimento da homozigotia na mutação V617F resulta de um processo que compreende duas etapas sequenciais:

- o ganho de uma mutação pontual;
- a recombinação mitótica que resulta da troca de segmentos de DNA que englobam o locus do gene *JAK2* (9p) entre as cromátides “não irmãs” dos cromossomas 9 homólogos durante a mitose (*Loss of heterozygosity* – LOH) (Campbell e Green, 2006).

Kralovics *et al* (2002) identificaram a perda de heterozigotia em três regiões genómicas nos cromossomas 9p, 10q e 11q e identificou a perda de heterozigotia do cromossoma 9p (9pLOH) como a lesão cromossómica mais frequente nos pacientes com PV.

A homozigotia¹ para a mutação V617F ocorre em cerca de 30% dos pacientes com PV e MFP, sendo rara nos pacientes com TE (2-4%) (Vannucchi *et al*, 2008 e Kim *et al*, 2013).

De uma forma geral, a mutação V617F está mais associada a doentes com idades mais avançadas, níveis aumentados de hemoglobina, leucocitose e baixas contagens de plaquetas. Alguns estudos sugerem que a presença de uma grande percentagem de células com a mutação (carga alélica elevada) está associada a fenótipos clínicos mais graves, não parecendo, no entanto, afetar a sobrevida ou a transformação em leucemia nos doentes com PV e TE. Na PV, níveis aumentados de alelos com mutação V617F, estão associados a prurido e transformação fibrótica. Na TE, a presença da mutação tem sido associada a um risco aumentado de trombose arterial e a um menor risco de desenvolver mielofibrose pós-trombocitémica. Por outro lado, na MFP um baixo nível de alelo mutado está associado a uma redução da sobrevida (Vannucchi *et al*, 2011; Tefferi (b), 2013).

4.2.1.2. Mutações no exão 12

Em 2007, foram descritas mutações no exão 12 do gene *JAK2* em pacientes com PV ou eritrocitose idiopática sem mutação V617F (5%) (Scott *et al*, 2007).

Actualmente, estão descritas pelo menos 19 mutações diferentes no exão 12 do gene *JAK2*, sendo a maioria deleções *in-frame*, mutações pontuais e duplicações, que afetam os codões 514 a 547, as quais codificam aminoácidos altamente conservados da proteína JAK2 (figura 4). A mutação p.N542_E543del é a mais frequentemente encontrada nestes casos. O facto de estes resíduos se situarem muito próximos ou mesmo dentro do domínio JH2 sugere que estas mutações possam interferir com a regulação negativa do domínio catalítico JH1 pelo domínio JH2, levando à desregulação da via de sinalização JAK-STAT (Jatiani *et al*, 2010; Carillo *et al*, 2011).

¹ No presente contexto, o termo homozigotia é definido como um nível de alelo mutado superior a 50% quando comparado com o alelo *wild type JAK2* (Kim *et al*, 2013).

As NMP com mutações no exão 12 do gene *JAK2* apresentam geralmente um fenótipo distinto, caracterizado por marcada eritrocitose, ausência de leucocitose ou trombocitose, baixos níveis de eritropoietina, hiperplasia eritróide isolada na medula óssea e, em alguns casos, crescimento de colónias endógenas eritróides (Martínez-Avilés *et al*, 2007). Estes pacientes geralmente apresentam níveis de eritropoietina abaixo do normal e uma idade jovem ao diagnóstico. O prognóstico é similar ao dos pacientes com PV positivos para a mutação V617F (Tefferi, 2010).

Estas mutações não estão descritas em pacientes com TE e MFP e ocorrem na maioria dos pacientes com PV negativos para a mutação V617F (Tefferi *et al*, 2009).

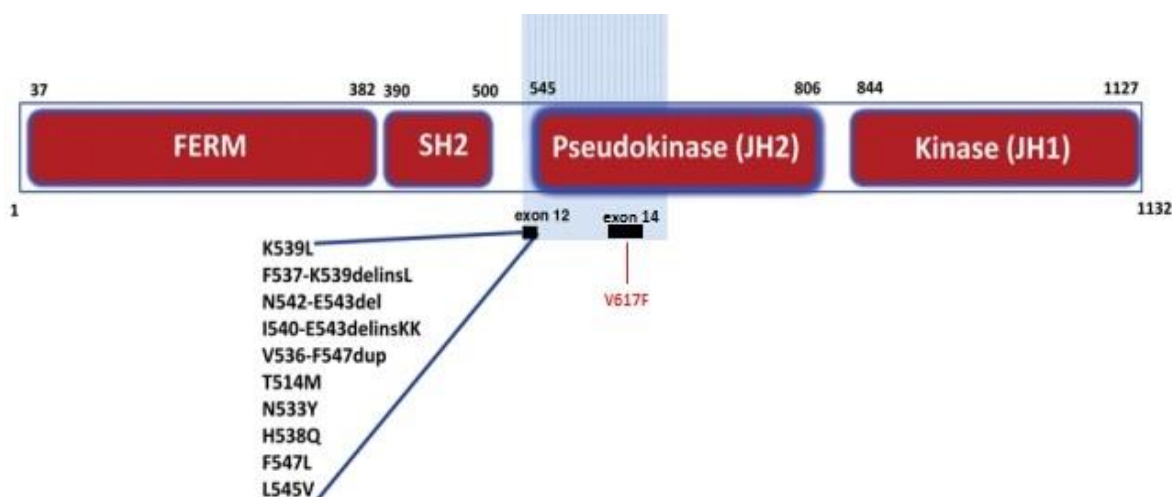


Figura 4 – Mutações no exão 12 do gene *JAK2*
(Adaptado de Jatiani *et al*, 2010)

4.2.2. Mutações no gene *MPL*

O gene *MPL* (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*) está localizado no cromossoma 1p34, inclui 12 exões e codifica para o recetor da trombopoietina (TPO) maioritariamente expresso nos progenitores hematopoiéticos e em células da linha megacariocítica (Tefferi *et al*, 2011).

Pikman *et al* investigaram a presença de mutações noutros componentes da via de sinalização JAK-STAT nos pacientes com TE e MFP negativos para a mutação V617F. Estes estudos permitiram a identificação de mutações somáticas no gene *MPL*. Determinadas regiões nos recetores de citocinas são críticas em processos como a dimerização dos recetores e consequente ligação das proteínas JAK2, levando à desregulação da via de sinalização JAK-STAT (Pikman *et al*, 2006).

Cerca de 3-4% dos doentes com TE e cerca de 4-10% dos doentes com MFP apresentam mutações no exão 10 do gene *MPL*. Numa minoria destes pacientes foram descritas múltiplas mutações no gene *MPL* ou a coexistência com a mutação V617F do gene *JAK2*. Estas mutações não foram encontradas em pacientes com PV (Boyd *et al*, 2010 e Tefferi *et al*, 2011).

A maioria das mutações detetadas no gene *MPL* afeta o aminoácido triptofano no codão 515. As mutações p.W515L e p.W515K são as mais comuns e as mutações p.W515S e p.W515A bem como a mutação S505N no codão 505 estão descritas numa frequência muito baixa. Estas mutações afetam um domínio da proteína cuja função é manter o receptor inativo na ausência de um ligando, resultando assim em proteínas constitutivamente ativas e independentes dos fatores de crescimento (Boyd *et al*, 2010).

As mutações do gene *MPL* estão associadas predominantemente a doentes com TE com idades mais avançadas, baixos níveis de hemoglobina, aumento de plaquetas, sintomas microvasculares (cefaleias, tonturas, parestesias, eritromelalgia e dor no peito atípica) e com alto risco de episódios de trombose arterial. A presença destas mutações não parece afetar a sobrevivência e o risco de transformação fibrótica ou leucémica. Nos doentes com MFP, a presença destas mutações, está mais associada ao sexo feminino, a idades mais avançadas, a baixos níveis de hemoglobina e a um aumento da probabilidade de estes doentes se tornarem dependentes de transfusões (Tefferi, 2010).

4.3. Diagnóstico diferencial

A presença de uma neoplasia mieloproliferativa não é, por si só, evidência de uma doença clonal. O problema major no diagnóstico das NMP consiste em distinguir se a mieloproliferação é devida a uma doença clonal ou a fatores secundários.

Com efeito, as características clínicas como eritrocitose, trombocitose ou fibrose medular podem ser observadas como condições reativas a determinadas patologias ou a condições clínicas, como por exemplo, em infecções. Assim, a exclusão destas causas secundárias torna-se obrigatória no diagnóstico clínico das diferentes NMP (Smith e Fan, 2008).

Neste sentido, a descoberta das mutações no gene *JAK2* e *MPL* tiveram um grande impacto no diagnóstico dos doentes com NMP, especialmente no diagnóstico diferencial entre estas e as condições mieloproliferativas reativas, uma vez que estas mutações ocorrem com elevada frequência nas NMP e são específicas de doenças clonais mielóides. A deteção de uma mutação no gene *JAK2* ou *MPL* estabelece a presença de uma doença clonal e confirma o diagnóstico de uma neoplasia mielóide. (Smith e Fan, 2008).

Por outro lado, a presença de mutações no gene *JAK2* não permite, por si só, a distinção entre as diferentes patologias mielóides, nomeadamente, a PV, TE e MFP, nem a sua ausência permite excluir um diagnóstico de NMP. A pesquisa de outras mutações, tais como mutações no exão 12 do gene *JAK2* ou no exão 10 do gene *MPL*, são recomendadas nos doentes V617F negativos (Tefferi (a), 2013).

A pesquisa de mutações no gene *JAK2* é reconhecida como essencial pela OMS no diagnóstico de PV, dado que, a grande maioria destes doentes são portadores de uma mutação no gene *JAK2* (tabela 5). O aumento da massa eritrocitária observada nestes doentes é uma característica confinada a esta patologia, facilitando também ao diagnóstico da PV (Kiladjian, 2012).

Por outro lado, a ausência das mutações V617F e das mutações no gene *MPL* não exclui o diagnóstico de TE ou MFP, uma vez que se encontram em cerca de

58-59% e 69-75% destes pacientes, respetivamente (tabela 5) (Boyd *et al*, 2010;Tefferi *et al*, 2011).

Tabela 5 – Mutações nos genes *JAK2* e *MPL* na PV, TE e MFP

Mutação	Frequência mutacional (%)
V617F <i>JAK2</i> (Exão 14)	PV ~ 96 TE ~ 55 MFP ~ 65
<i>JAK2</i> - Exão 12	PV ~ 3 TE ~ raro MFP ~ raro
<i>MPL</i> – Codão 515	PV ~ raro TE ~ 3-4 MFP ~ 4-10

5. TRATAMENTO DA PV, TE E MFP

O tratamento dos doentes com PV e TE tem como finalidade primária a prevenção de complicações trombo-hemorrágicas que ocorrem em cerca de 20% destes doentes. O tratamento também visa o controle de distúrbios vasomotores, tais como cefaleias, vertigens, parestesias acrais, eritromelalgia e dores no peito atípicas, e, no caso dos doentes com PV, o prurido. Assim, o tratamento é direcionado a cada paciente, de acordo, com a presença ou ausência dos fatores de risco estabelecidos para o desenvolvimento de trombose ou hemorragia (tabela 6) (Tefferi (a), 2013).

Existem diversos estudos que comprovam a eficácia da administração de baixas doses de aspirina na prevenção de trombooses e no alívio dos distúrbios vasomotores associados a estas patologias. No entanto, nos pacientes com extrema trombocitose, o uso de aspirina poderá causar complicações hemorrágicas, principalmente nos doentes que desenvolveram a Síndrome de von Willebrand Adquirida². O uso da aspirina deverá ser considerado caso o doente

² Síndrome de von Willebrand Adquirida - doença hemorrágica adquirida causada por uma diminuição ou uma disfunção da proteína chamada factor de von Willebrand (FvW) (Tiede *et al*, 2013).

apresente uma diminuição dos níveis do fator de von Willebrand (Tefferi (a), 2013).

As flebotomias são essenciais na manutenção do hematócrito em níveis normais (<45%) dos doentes com PV. O uso de anti-histamínicos, inibidores seletivos da recaptção da serotonina, inibidores de JAK, interferão- α e fototerapia com ultravioletas B da banda estreita, bem como a manutenção da pele hidratada e o uso de água tépida nos banhos, ajudam a aliviar os sintomas de prurido associados à maioria dos pacientes com PV (Tefferi (a), 2013).

Nos doentes com alto risco para desenvolver trombose está indicada a terapia citorrredutora no controlo da mieloproliferação e na manutenção dos valores normais de leucócitos e plaquetas. A hidroxiureia ou interferão- α são considerados os fármacos de primeira linha na terapia citorrredutora, embora possa ocorrer intolerância e resistência a estes agentes (Tefferi e Barbui, 2013).

Tabela 6 – Tratamento e grupos de risco dos doentes com PV e TE

Grupo de risco	PV	TE
<u>Baixo-risco</u>		
idade ≤ 60 anos sem história de trombocitose	Baixas doses de aspirina + flebotomia	Baixas doses de aspirina
<u>Alto-risco</u>		
idade ≥ 60 anos e/ou história de trombose	Baixas doses de aspirina + flebotomia + terapia citorrredutora	Baixas doses de aspirina + terapia citorrredutora

Até à data, não existem medicamentos com eficácia na cura e aumento da sobrevida dos doentes com MFP. O transplante alogénico das células da medula óssea é o único tratamento com potencial curativo da MFP. No entanto, as taxas de mortalidade e morbilidade graves a que está associado são substanciais (cerca de 50%), estando apenas indicado nos pacientes com pior prognóstico (Tefferi (b), 2013). Assim, o tratamento destes doentes tem como finalidade o alívio dos sinais clínicos, anemia e dor óssea (androgénios, talidomida ou

danazol) e a diminuição do tamanho do baço nos doentes com esplenomegalia sintomática (hidroxiureia, esplenectomia e radioterapia) (Tefferi e Barbui, 2005; Tefferi (b), 2013).

5.1. Inibidores de JAK2

O reconhecimento do envolvimento da via de sinalização JAK-STAT em várias doenças hematológicas, especialmente nos NMP BCR-ABL1 negativos levou à identificação de potenciais alvos moleculares atrativos para o tratamento destas patologias (Furgan *et al*, 2013).

Os inibidores de JAK2 estão entre os primeiros agentes a revelar sucesso nas investigações clínicas. Atualmente, existem vários inibidores de JAK2 em várias fases de ensaios clínicos (Furgan *et al*, 2013). De entre estes, alguns já foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo especialmente indicados no tratamento da mielofibrose em doentes com MFP ou na fase pós-policitémica e pós-trombocitémica com mielofibrose da PV e TE, respetivamente (Tefferi (b), 2013).

A terapia com inibidores de JAK2 revelou um aumento significativo na qualidade de vida destes doentes. Esta característica torna estes agentes opções atrativas à terapia citorredutora em doentes intolerantes ou resistentes à hidroxiureia ou interferão- α (Jatiani *et al*, 2010).

Actualmente, os benefícios da terapia com inibidores de JAK2 são apenas paliativos, dado que não têm sido observadas evidências da alteração do curso natural da doença nem a redução do nível de alelos mutados nos doentes *JAK2* V617F positivos. Estes dados sugerem que outros eventos moleculares possam estar associados ao desenvolvimento destas neoplasias e sugerem a necessidade da combinação de terapias com intervenção simultânea em múltiplos níveis da via de sinalização JAK-STAT (Furgan *et al*, 2013).

6. TÉCNICAS MOLECULARES DE DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES DOS GENES *JAK2* E *MPL*

A descoberta das mutações no gene *JAK2* e *MPL* em pacientes com NMP tem implicações diretas na abordagem clínica, isto é, no diagnóstico, prognóstico e no tratamento. Não existe acordo entre as frequências das mutações V617F *JAK2*, do exão 12 do gene *JAK2* e do exão 10 do gene *MPL* nas diferentes patologias, já que as mesmas diferem de estudo para estudo. Estas diferenças poderão estar relacionadas com a utilização de métodos laboratoriais distintos, com sensibilidades diferentes.

Atualmente, estão descritas uma variedade de técnicas moleculares altamente sensíveis para a detecção destas mutações, em particular para a mutação V617F. Estas técnicas incluem PCR alelo específico (AS-PCR) ou ARMS (**A**mplification **R**efractory **M**utation **S**ystem), métodos de pirosequenciação, PCR-RFLP (**R**estriction **F**ragments **L**ength **P**olymorphism), dHPLC (**d**enaturing **H**igh-**P**erformance **L**iquid **C**hromatography), *allele blocker* PCR, PCR em tempo real e análise por curvas de *melting*. Cada uma destas técnicas tem vantagens e limitações, distinguindo-se pela sua sensibilidade, especificidade, rapidez e custo (tabela 7) (Steensma *et al*, 2006; Cankovic *et al*, 2009; Er *et al*, 2009; Qian *et al*, 2010).

A sequenciação é tradicionalmente considerada a técnica padrão usada na detecção de alterações na sequência de DNA devido à direta observação da sequência em análise. Por esta razão, é correntemente utilizada esta técnica na detecção das mutações no exão 12 do gene *JAK2* e no exão 10 do gene *MPL*. Qian *et al* (2010), descreveram a sequenciação como uma técnica com uma taxa de sensibilidade que pode variar entre os 10 e 40%, o que poderá ser um fator limitante na detecção de mutações somáticas quando a percentagem de células mutadas é baixa.

Tabela 7 – Sensibilidade das técnicas moleculares para a detecção da mutação V617F

Técnicas moleculares	Sensibilidade (%)
Sequenciação	10-40
AS-PCR/ARMS	1-3
Pirosequenciação	5-10
PCR-RFLP	20
dHPLC	<1-2
HRM	5
PCR em tempo real	<0,1

6.1. PCR Alelo-Específico (AS-PCR)

A técnica de PCR alelo específico (AS-PCR) é uma das técnicas tradicionalmente mais usadas na detecção da mutação V617F. Foi inicialmente reportada por Baxter *et al*, em 2005, como uma técnica de diagnóstico para a detecção da mutação V617F com uma sensibilidade de 3% (Baxter *et al*, 2005).

O AS-PCR é frequentemente usado na detecção de SNPs (**S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphisms), isto é, variações de um único nucleótido na sequência de DNA. O princípio desta técnica baseia-se na especificidade da amplificação das sequências de DNA mutadas, que é conseguida com o uso de um *primer* específico para a mutação, na reação de PCR. Para além disso, a sequência do *primer* específico é intencionalmente construída com um erro de sequência (*mismatch*) na extremidade 3', diminuindo a eficiência do *annealing* entre o *primer* e as sequências sem o SNP, aumentando assim a especificidade da reação (figura 5) (Steensma, 2006).

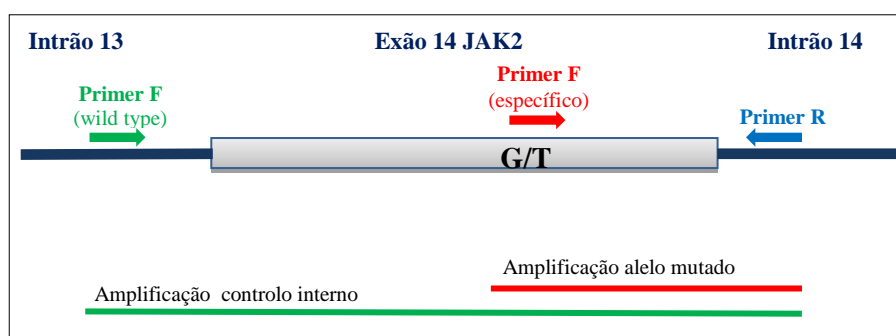


Figura 5 – Esquema do AS-PCR para a detecção da mutação V617F

6.2. High Resolution Melting (HRM)

A detecção de mutações por HRM constitui um método recente e elegante para a identificação de alterações de sequência.

Malentacchi *et al* (2009) descreveram o HRM como uma técnica que pode ser usada para detetar variações de DNA em amostras compostas maioritariamente por alelos *wild-type*, atingindo uma sensibilidade próxima dos 5%. No mesmo ano, Rapado *et al*, consideraram a técnica de HRM como o método ideal para a detecção de mutações nos exões 12 e 14 do gene *JAK2*, devido à sua simplicidade, especificidade e sensibilidade.

O HRM consiste fundamentalmente num PCR convencional seguido de uma desnaturação (*melting*) dos produtos de PCR. O princípio desta técnica baseia-se na distinção dos produtos de PCR através da análise das curvas de *melting* (temperatura de *melting* e forma) geradas pela dissociação das cadeias de DNA quando sujeitas a temperaturas crescentes. O comportamento das curvas de *melting* dos produtos de PCR depende do seu conteúdo em bases G e C, comprimento, composição da sua sequência e heterozigotia (Qian *et al*, 2010).

OBJETIVOS

Foram objetivos deste estudo:

1 – Comparar a técnica de *High Resolution Melting* (HRM) com a técnica de PCR alelo específico (AS-PCR) para a detecção da mutação V617F no gene *JAK2*, avaliando a sua taxa de concordância.

2 – Avaliar a utilidade da técnica de HRM na detecção de mutações no exão 12 do gene *JAK2* e no exão 10 do gene *MPL*.

3 - Determinar a frequência das mutações do gene *JAK2* e *MPL* em doentes estudados no GDPN, com diagnóstico clínico de policitemia vera, trombocitemia essencial, mielofibrose primária e neoplasia mieloproliferativa não classificada.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAL

Neste estudo foram utilizadas 160 amostras de sangue periférico de doentes com suspeita de diagnóstico de neoplasia mieloproliferativa, recebidos no laboratório GDPN – Genética Médica e Diagnóstico Pré-Natal, para efeitos de diagnóstico genético, no período de Abril de 2011 a Setembro de 2012.

As amostras referidas foram colhidas em tubos estéreis com anticoagulante EDTA e entregues no laboratório para processamento até 24 horas após a colheita.

A totalidade das amostras foram analisadas pelas técnicas de PCR alelo específico (AS-PCR) e *High Resolution Melting* (HRM) para a mutação V617F no gene *JAK2*. Desta série, foram selecionadas para a pesquisa de mutações no exão 12 do gene *JAK2* por HRM os casos com resultado negativo para a mutação V617F e com indicações clínicas sugestivas de PV, constituindo um total de 36 casos. Da série inicial, foram ainda selecionadas as amostras negativas para a mutação V617F e com indicação clínica sugestiva de TE ou MFP para a pesquisa de mutações no exão 10 do gene *MPL* por HRM, constituindo um total de 31 casos.

Foram usadas 5 amostras de sangue periférico de dadores saudáveis e 8 amostras com quantidades conhecidas da mutação V617F (100%, 22%, 10%, 7%, 6%, 5%, 3%, 2% e 1% de células com mutação) para determinar os limites de sensibilidade da técnica de HRM.

Para validar a técnica de HRM para a pesquisa de mutações no exão 12 do gene *JAK2* e no exão 10 do gene *MPL* foram utilizadas em cada ensaio 3 amostras com mutação para as referidas regiões.

2. MÉTODOS

2.1. Processamento das amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico foram submetidas à lise dos eritrócitos por adição de uma solução hipotônica (AKE: NH_4Cl [Merck] 155 mM; KHCO_3 [Merck] 10 mM; EDTA 0,1 mM; pH=7,4) a 3-5 mL de sangue numa proporção de 9 a 10 vezes desse volume, seguida de incubação a -20°C durante 10 minutos. Centrifugou-se a 4°C (2500 rpm, 7 min). Desprezou-se o sobrenadante e este processo foi repetido tantas vezes quantas as necessárias até ao desaparecimento da hemoglobina do sedimento e do sobrenadante. Nesta fase as amostras foram armazenadas a -20°C ou utilizadas diretamente procedendo-se à extração de DNA.

2.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo do Citogene Kit de Purificação de DNA genómico [Citomed]:

- Adicionou-se ao precipitado de células nucleadas 3 ml de solução Cell Lysis e 40 μL de proteinase-K [Sigma] (10 mg/ml);
- Misturou-se suavemente e incubou-se a 56°C durante a noite;
- Adicionou-se 1 ml de solução Protein Precipitation ao lisado anterior e agitou-se no vortex a uma velocidade elevada durante 20 segundos;
- Centrifugou-se a 4°C (4000 rpm; 10 min);
- O sobrenadante foi recolhido e precipitado com 3 ml de isopropanol a 100% [Merck];
- O DNA obtido foi lavado com etanol [Panreac] a 70% (v/v) e no final eluído em água destilada [Braun].

A concentração de DNA extraído de cada amostra foi determinada por leitura espectrofotométrica [SmartSpec™ Plus - BioRad] a 260 nm, de forma a que a fórmula – $\text{Abs}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{fator de diluição}$ – permitisse calcular a concentração do DNA em $\mu\text{g/mL}$, tendo como referência que 1 unidade de densidade ótica a 260 nm corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de cadeia dupla. Simultaneamente verificou-se o grau de contaminação proteica, calculando o valor da razão $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$, sendo os valores localizados no intervalo 1,65-2,00 considerados aceitáveis.

O armazenamento das amostras foi efetuado a 4°C ou a –20°C, dependendo do tempo de armazenamento (maior tempo de armazenamento, mais baixa a temperatura).

2.3. Pesquisa da mutação V617F no gene *JAK2* por PCR Alelo Específico (AS-PCR)

2.3.1. Reação em cadeia da polimerase

Para a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) usaram-se oligonucleótidos iniciadores de síntese (*primers*) descritos por Baxter *et al* (2005) específicos para o exão 14 do gene *JAK2*, denominados por JAK-J1, JAK-J2 e JAK-J3 (tabela 8).

Os *primers* JAK-J1 (*reverse*) e JAK-J2 (*forward* específico) amplificam apenas alelos com mutação V617F e originam um produto de 203 pares de bases (bp). Os *primers* JAK-J1 (*reverse*) e JAK-J3 (*forward* controlo interno) funcionam como controlos internos da reação, amplificando tanto alelos normais como alelos mutantes V617F. Estes *primers* originam um fragmento de 364 bp.

A reação de amplificação foi efetuada num volume total de 30 μL de uma solução contendo: 6 μL de 5x GoTaq® Reaction Buffer [Promega], 1,8 μL de MgCl_2

[Promega] (1,5 mM), 1,2µL de dNTP's [GE Healthcare] (250µM dTTP, 250µM dATP, 250µM dGTP, 250µM dCTP), 2µL do *primer* JAK-J1 (0,5 µM) e 1 µl dos primers JAK-J2 e JAK-J3 (0,5µM), 0,2µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase [Promega] (1 U), 100 ng de DNA genómico e 16,2 µL de água destilada.

Num termociclador Applied Biosystems *Gene-Amp PCR System 9700*, as amostras foram desnaturadas a 95°C durante 2 minutos, sujeitas a 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, emparelhamento (*annealing*) a 58°C durante 1 minuto, extensão a 72°C durante 1 minuto e, por fim, um ciclo de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

2.3.2. Eletroforese em gel de agarose

Os resultados foram analisados após separação eletroforética dos produtos de PCR em gel de agarose 2% (p/v) corado com brometo de etídio. O gel de agarose foi realizado com 2g de agarose e 100 mL de tampão TBE (1x tris-borato). A dissolução da agarose no tampão é feita através do aquecimento da solução num micro-ondas. Após arrefecimento com água corrente fria adicionou-se 5µL de brometo de etídio à solução. Após solidificação do gel (cerca de 15 minutos à temperatura ambiente), este é emerso numa tina eletroforética contendo tampão TBE a 1x. Foram pipetados 10µL de cada produto de PCR misturados com 5 µL de 6x loading buffer. Na mesma corrida foi adicionado um *ladder* de 50bp [Fermentas]. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica com 120V durante aproximadamente 30 minutos. Os géis foram analisados num transiluminador com luz UV.

2.4. Pesquisa das mutações V617F, exão 12 do gene *JAK2* e exão 10 do gene *MPL* por *High Resolution Melting* (HRM)

As reações de amplificação foram efetuadas num termociclador BIO-RAD CFX-96™ Real-Time System num volume total de 10µL de uma solução contendo: 5µL de Sso-Fast™ EvaGreen®Supermix [BIO-RAD], 1µL de cada *primer* (5µM), 5-20 ng de DNA genómico e 1µL de água destilada.

As condições de amplificação e de *melting* utilizadas na pesquisa da mutação V617F, mutações no exão 12 do gene *JAK2* e no exão 10 do gene *MPL* encontram-se descritas na tabela 8. A análise das curvas de melting foi realizada com o *software* Bio-Rad Precision Melt Analysis.

Tabela 8 – Programas de PCR por HRM

Fase do PCR	V617F – JAK2	Exão 12 JAK2	Exão 10 - MPL
Desnaturação	95°C/2:00	95°C/10:00	95°C/2:00
Amplificação	95°C/00:10 60°C/00:10 (plate read) <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 2em;">}</div> 50x	95°C/00:15 56°C/00:15 (plate read) <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 2em;">}</div> 60x	95°C/00:10 60°C/00:10 (plate read) <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 2em;">}</div> 55x
Extensão final	(Não se aplica)	72°C/10:00	(Não se aplica)
Desnaturação	95°C/00:30	95°C/1:00	95°C/00:30
Melting	65°C-95°C, aumento de 0,2°C/00:10 Plate read	65°C-95°C, aumento de 0,2°C/00:10 Plate read	65°C-95°C, aumento de 0,2°C/00:10 Plate read

Os *primers* utilizados para a amplificação das regiões de interesse do exão 14 (codão 617) do gene *JAK2* e do exão 10 do gene *MPL* por HRM foram construídos através do programa computacional *primer3*. Para a amplificação do exão 12 do gene *JAK2* e respetivas zonas de transição exão-intrão utilizaram-se os *primers* descritos por Rapado *et al* (2009) (tabela 9).

Tabela 9 – Sequências dos *primers* utilizados

Região	Primer	Técnica	Sequência	Tamanho amplificação (bp)
V617F JAK2	J1	AS-PCR	5' CTGAATAGTCCTACAGTGTTTTTCAGTTTCA 3'	203 364
	J2		5' AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATT 3'	
	J3		5' ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG 3'	
V617F JAK2	V617F-HRM-F V617F-HRM-R	HRM	5' CAAGCATTTGGTTTTAAATTATGGA 3' 5' AAGGCATTAGAAAGCCTGTAGTTTT 3'	78
Exão 12 JAK2	Ex12JAK-F Ex12JAK-R	HRM	5' CTCCTCTTTGGAGCAATTCA 3' 5' CCAATGTCACATGAATGTAAATC 3'	280
Exão 10 MPL	Ex10MPL-F Ex10MPL-R	HRM	5' GTGACCGCTCTGCATCTAGTGCT 3' 5' CACCTGGTCCACCGCCAGTCT 3'	150

2.5. Sequenciação do exão 12 do gene *JAK2* e do exão 10 do gene *MPL*

Os produtos de amplificação obtidos no HRM foram usados, posteriormente, para a análise de sequenciação.

2.5.1. Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de amplificação foi realizada segundo o protocolo do GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit [Illustra™] com o intuito de remover sais, enzimas, nucleótidos e *primers* não incorporados.

2.5.2. Reação de sequenciação

A reação de sequenciação foi efetuada utilizando o BigDye® Terminator sequence kit version 1.1 [Applied Biosystems], num volume final de 10 µL de solução contendo, 30 a 90 ng de produto de PCR, 1µL de Terminator Ready Reaction Mix, 1,9µL de BigDye Sequencing Buffer, 2µL de *primer* (0,32µM) e água destilada até perfazer o volume final. A reação foi realizada num termociclador AB, *Gene-Amp PCR System 9700* e, consistiu em 25 ciclos de desnaturação a 96°C durante 10 segundos, *annealing* a 50°C durante 5 segundos e extensão a 60°C durante 4 minutos. Esta técnica baseia-se no método de Sanger ou método *dideoxi* (Sanger *et al*, 1977).

Com o objetivo de retirar o excesso de dideoxinucleótidos marcados, dideoxinucleótidos não marcados e *primers* não incorporados, procedeu-se à precipitação do produto de sequenciação. Para tal, preparou-se as colunas de purificação submetendo-se a solução preparada de Sephadex® Gel Filtration Media [GE Healthcare] a uma centrifugação com velocidade de 4400 RPM durante 4 minutos. De seguida foi pipetada para a coluna de gel formada a totalidade do produto de sequenciação e centrifugado (4400 RPM - 4 minutos). A coluna foi desprezada e ao precipitado obtido foi adicionado 12µL de um agente químico desnaturante, neste caso, formamida [Applied Biosystems], e submetido a um sequenciador automático ABI PRISM™ Genetic Analyser [Applied Biosystems].

As sequências obtidas foram comparadas com a sequência do gene *JAK2* (nº de acesso ao GenBank: NM_004972.3) e gene *MPL* (nº de acesso ao GenBank: NM_005373.2).

2.6. Quantificação da mutação V617F do gene *JAK2* por PCR em tempo real

A quantificação da mutação V617F foi efetuada utilizando o JAK2 mutaQuant kit [Iposogen]. Em cada ensaio, foram amplificados, em reações separadas, os alelos mutados e os alelos normais (*wild type*) para a região de interesse, para cada amostra e para o controlo positivo e negativo (incluídos no *kit*). Cada reação foi efetuada num volume final de 25 µL de solução contendo, 5 µL (25 ng) de DNA, 12,5µL de TaqMan Universal Master Mix 2x, 1,0µL da respetiva mistura de *primers* e sondas e 6,5µL de água destilada. Em cada ensaio foram incluídos os *standards* de calibração fornecidos com o *kit*, para a realização das curva-padrão do alelo mutado e para o alelo normal (4 concentrações diferentes). A reação de PCR foi realizada num PCR *real time* Applied Biosystems 7300 com o seguinte protocolo:

Modo de análise: Standard Curve — Absolute Quantitation

Passo 1: 50°C/ 2 minutos

Passo 2: 95°C/ 10 minutos

Passo 3: 50 ciclos - 95°C/ 15 segundos

63°C/ 1,30 minutos com aquisição de fluorescência (FAM)
e Quencher (TAMRA)

Os resultados foram expressos em percentagem da mutação V617F e calculados da seguinte forma:

$$\text{V617F JAK2 \%} = \text{CN}_{\text{V617F}} / (\text{CN}_{\text{V617F}} + \text{CN}_{\text{WT}}) \times 100$$
, em que CN é o número de cópias e WT o alelo *wild type*.

RESULTADOS

O grupo de doentes incluídos neste estudo foi constituído por 95 homens e 65 mulheres, com idades compreendidas entre os 2 e 94 anos, sendo a idade média ao diagnóstico de 62,3 anos (mediana: 66 anos). Dos 160 doentes, 32 apresentavam diagnóstico clínico sugestivo de PV, 26 de TE e 4 de MFP. Foram ainda estudados 23 doentes com poliglobulia ou eritrocitose, 27 doentes com trombocitose, 6 doentes com leucocitose, 2 doentes com suspeita de poliglobulia secundária e 40 doentes com NMP não classificada (tabela 10).

Tabela 10 – Diagnósticos clínicos/Achados clínicos dos doentes com suspeita de NMP e respetivos resultados da pesquisa de mutações nos genes *JAK2* e *MPL*

Diagnóstico Provisório/ Achados clínicos	Nº de doentes	Resultados positivos (%)		
		V617F <i>JAK2</i>	Exão 12 <i>JAK2</i>	Exão 10 <i>MPL</i>
PV	32	24/32 (75,0%)	2 [#] /7* (28,6%)	NR
Poliglobulia/Eritrocitose	23	3/23 (13,0%)	2 [#] /20 (10,0%)	NR
Poliglobulia secundária/PV	2	0/2 (0%)	0/1* (0%)	NR
TE	26	8/26 (30,8%)	NR	1 ^{##} /17* (5,9%)
Trombocitose	27	18/27 (66,7%)	NR	0/9 (0%)
MFP	4	0/4 (0%)	NR	1/3* (33,3%)
Leucocitose	6	0/6 (0%)	0/6 (0%)	NR
NMP não classificada	40	12/36** (33,3%)	NR	NR

NR – não se realizou

Apenas uma das mutações foi confirmada por sequenciação

Mutação não confirmada por sequenciação

*Não se obteve produto de amplificação em 1 amostra

** Não se obteve produto de amplificação em 4 amostras

1. COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE HRM E AS-PCR NA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO V617F NO GENE *JAK2*

Foi realizada a pesquisa da mutação V617F no gene *JAK2* por HRM nas 160 amostras selecionadas, as quais tinham sido previamente estudadas pela técnica de AS-PCR.

A técnica de HRM permitiu obter resultado em 156 das 160 amostras testadas. As restantes 4 amostras foram excluídas por insucesso na amplificação.

Considerando o AS-PCR como a técnica padrão para a pesquisa da mutação V617F, foi avaliada a especificidade e sensibilidade da técnica de HRM. Das 65 amostras positivas para a mutação V617F por AS-PCR, 64 foram detetadas por HRM, o que traduz uma sensibilidade desta técnica de 98,5%. Em todas as amostras negativas para a mutação V617F por AS-PCR (91) obtiveram-se os mesmos resultados pela técnica de HRM, o que traduz uma especificidade de 100% (gráfico 1).

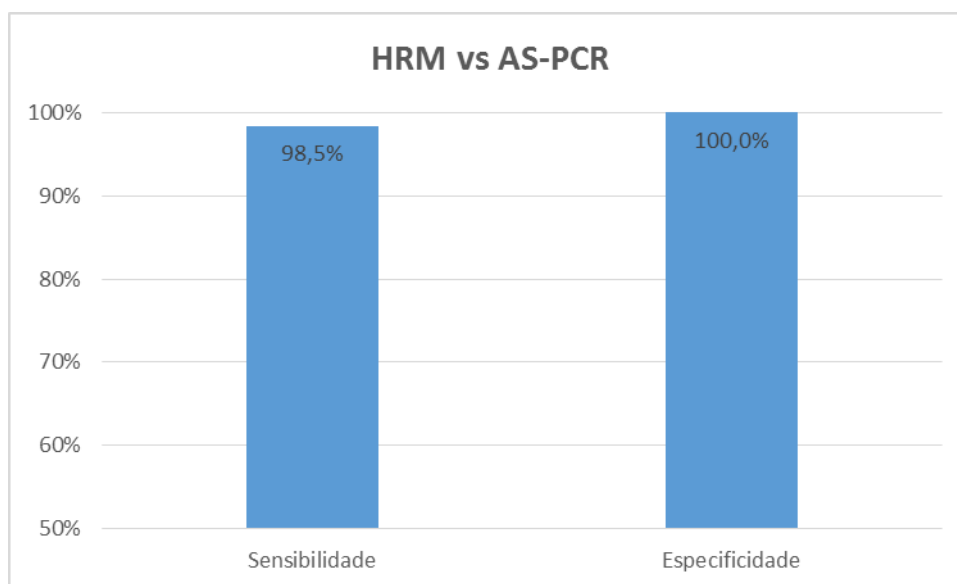


Gráfico 1 – Sensibilidade e especificidade do HRM na deteção da mutação V617F (comparação com a técnica de AS-PCR).

A análise dos controlos positivos utilizados na técnica de HRM revelou que esta técnica permitiu a deteção da mutação V617F nas amostras com pelo menos 5% de células mutadas (figura 6). Os controlos com 1, 2 e 3% de células mutadas não foram distinguidos dos controlos negativos pela técnica de HRM.

A análise da amostra 42, cujo resultado obtido pelas técnicas de AS-PCR e HRM não foi concordante, por PCR em tempo real, revelou a presença da mutação V617F no gene *JAK2* em 2,2% das células da amostra.

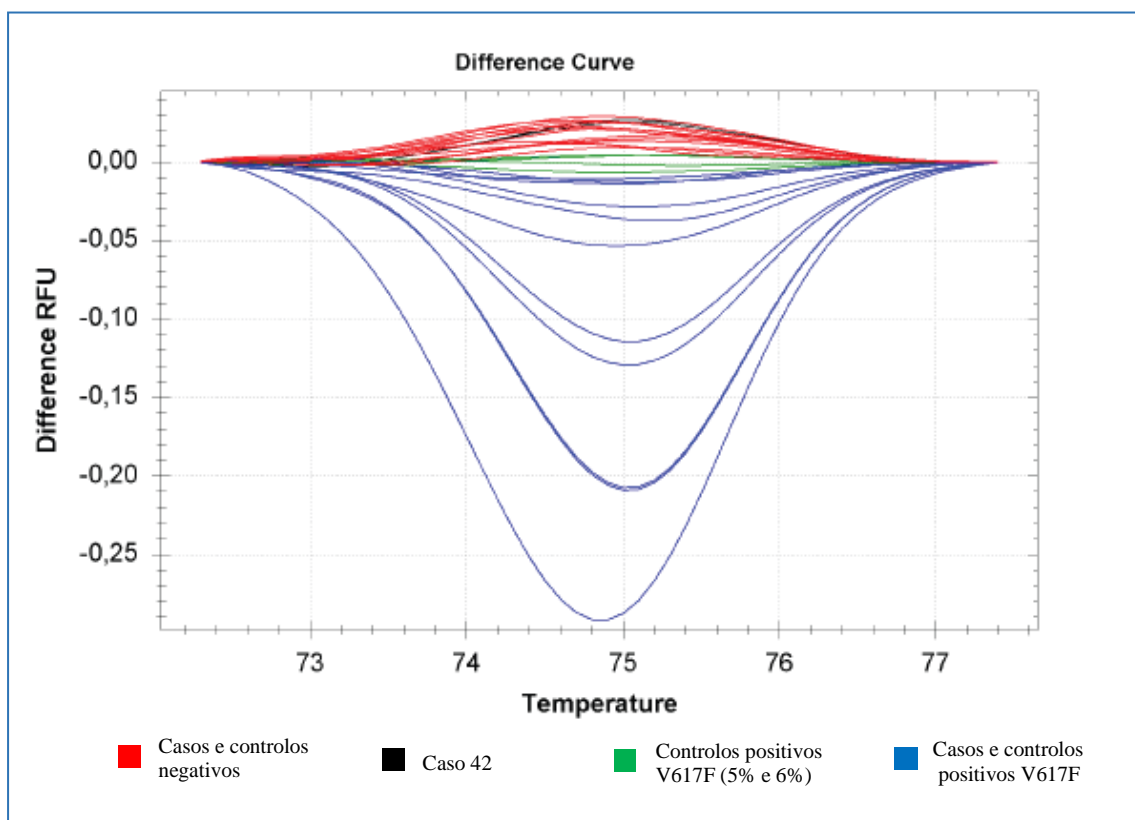


Figura 6 – Resultados da análise da mutação V617F do gene *JAK2* por HRM

2. ANÁLISE DA TÉCNICA DE HRM NA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO EXÃO 12 DO GENE *JAK2*

A técnica de HRM permitiu obter resultado em 34 dos 36 casos selecionados para a pesquisa de mutação no exão 12 do gene *JAK2* (tabela 10). Nos restantes 2 casos não se obteve produto de amplificação.

Das 34 amostras estudadas, 30 apresentaram um padrão compatível com ausência de mutações e 4 apresentaram um padrão alterado, isto é, sugestivo da presença de uma mutação na região estudada.

A sequenciação das 30 amostras com padrão normal por HRM não revelou alterações de sequência. Das 4 amostras com padrão alterado por HRM, a sequenciação confirmou a existência de mutação em apenas duas (tabela 11).

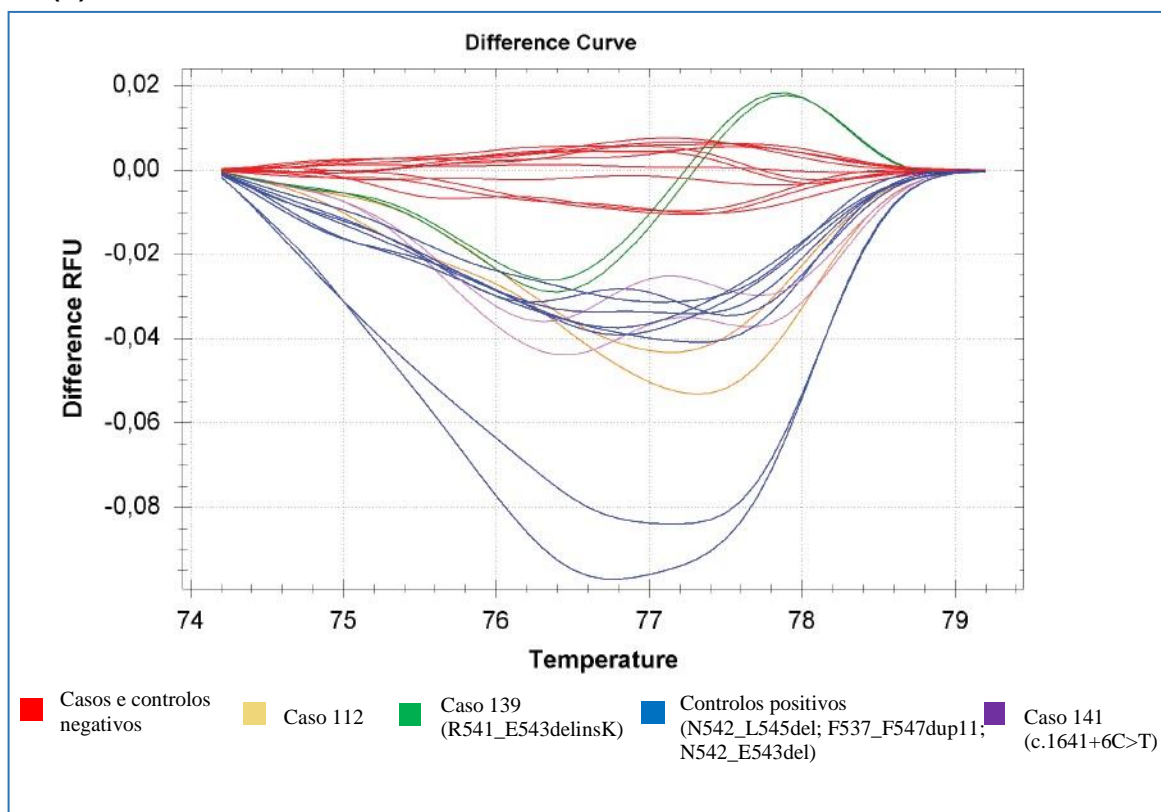
Das 2 mutações detetadas no exão 12 do gene *JAK2* apenas uma se encontra descrita na literatura como comprovadamente patogénica (p.R541_E543delinsK, c.1624_1629delGAAATG), tendo sido detetada num doente com diagnóstico de PV (tabela 11; figura 7).

Tabela 11 – Amostras com padrão alterado na pesquisa de mutações no exão 12 do gene *JAK2* por HRM

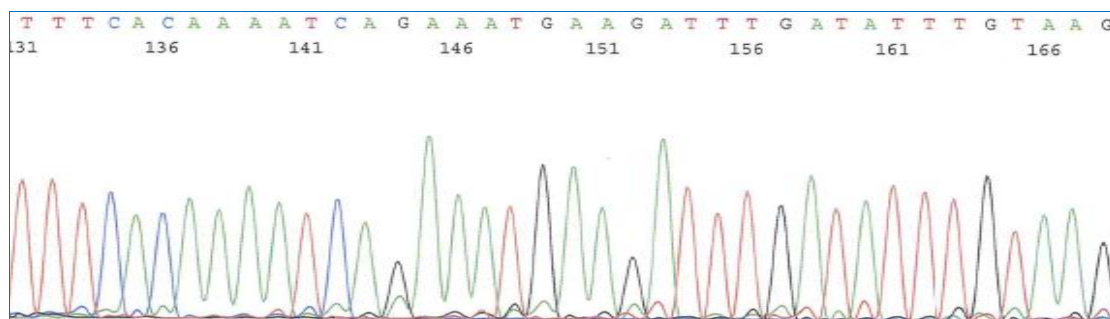
Doente (nº)	Diagnóstico Provisório/ Achados clínicos	Resultados das técnicas moleculares exão 12 <i>JAK2</i>		Significado clínico
		HRM	Sequenciação	
11	Eritrocitose	+	-	NA
112	PV	+	-	NA
139	PV	+	p.R541_E543delinsK	Patogénica
141	Poliglobulia	+	c.1641+6T>C	Não descrita

(+) Presença de mutação; (-) Ausência de mutação; (NA) Não se aplica

(A)



(B1)



(B2)

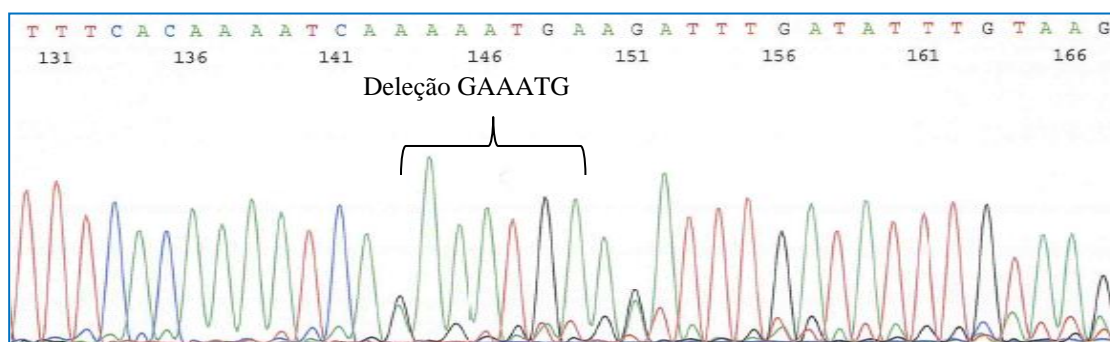


Figura 7 – Resultados da análise do exão 12 do gene *JAK2* por HRM (A) e sequenciação (B).
 (B1) Caso 112, sem mutação; (B2) Caso 139, com mutação p.R541_E543delinsK em heterozigotia.

3. ANÁLISE DA TÉCNICA HRM NA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO EXÃO 10 DO GENE *MPL*

Dos 31 casos selecionados para a pesquisa de mutações no exão 10 do gene *MPL* foi obtido resultado com a técnica de HRM em 29 (tabela 10). Nos restantes 2 casos não se obteve produto de amplificação.

Nas 29 amostras estudadas, 27 apresentaram um padrão compatível com ausência de mutação e 2 apresentaram um padrão alterado sugestivo da presença de mutação.

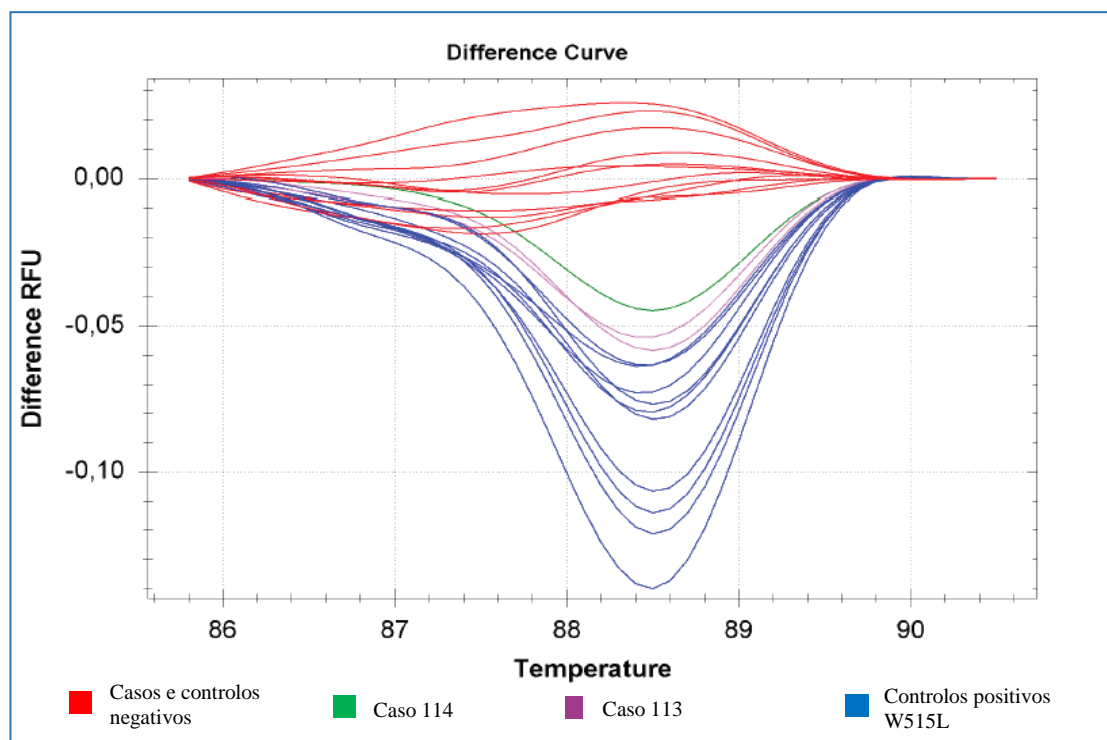
A sequenciação das 27 amostras com padrão normal por HRM não revelou alterações de sequência. Das 2 amostras com padrão alterado por HRM, a sequenciação confirmou a existência de mutação no exão 10 do gene *MPL* em apenas uma amostra (p.W515L; c.1544G>T), a qual correspondia a um caso com diagnóstico clínico de MFP (tabela 12; figura 7).

Tabela 12 – Amostras com padrão alterado na pesquisa de mutações no exão 10 do gene *MPL* por HRM

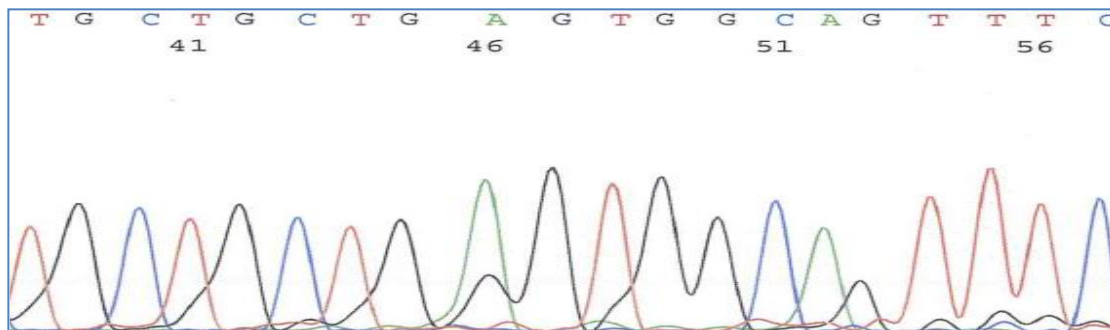
Doente (nº)	Diagnóstico Provisório	Resultados das técnicas moleculares exão 10 <i>MPL</i>		Significado clínico
		HRM	Sequenciação	
113	MFP	+	p.W515L	Patogénico
114	TE	+	-	NA

(+) Presença de mutação (-) Ausência de mutação; (NA) Não se aplica

(A)



(B1)



(B2)

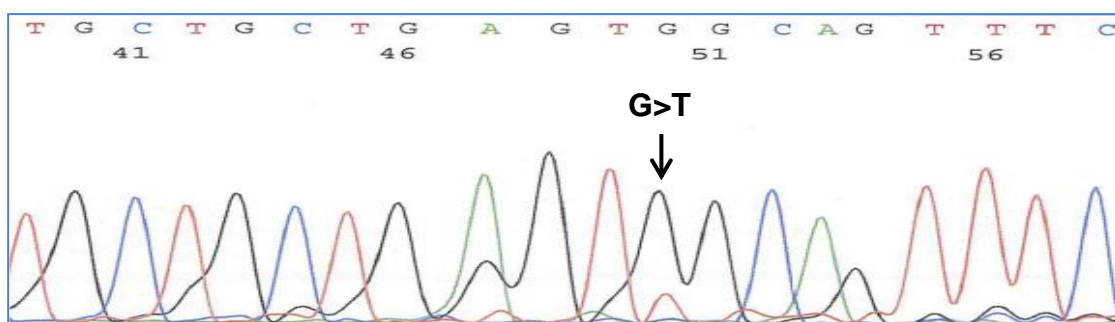


Figura 7- Resultados da análise do exão 10 do gene *MPL* por HRM (A) e sequencição (B). (B1) Caso 114, sem mutação; (B2) Caso 113, com mutação W515L.

4. FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE *JAK2* E *MPL* NOS DOENTES COM PV, TE, MFP E NMP NÃO CLASSIFICADA

A análise do codão 617 e do exão 12 do gene *JAK2*, bem como do exão 10 do gene *MPL* nos 152 doentes com resultado obtido por HRM demonstrou a presença de mutações com significado clínico em 80,6% (25/31) dos doentes com PV, em 32,0% (8/25) dos doentes com TE e em 33,3% (1/3) dos doentes com MFP (gráfico 2).

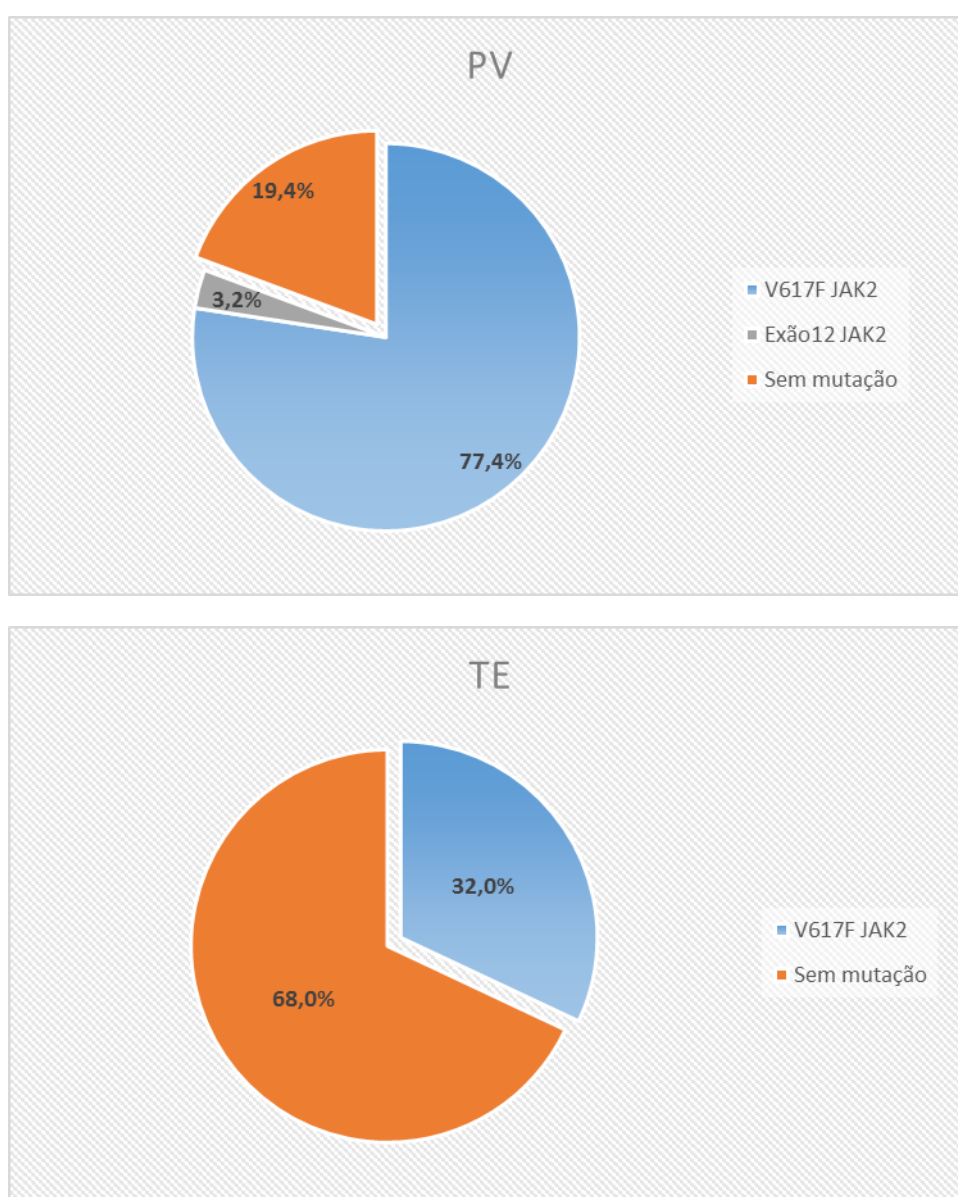


Gráfico 2 – Frequência de mutações nos doentes com PV e com TE.

A mutação V617F foi detetada em 3 doentes cuja indicação clínica para estudo era de poliglobulia e/ou eritrocitose, em 18 doentes com presença de trombocitose e em 12 doentes com NMP não classificada (gráfico 3).

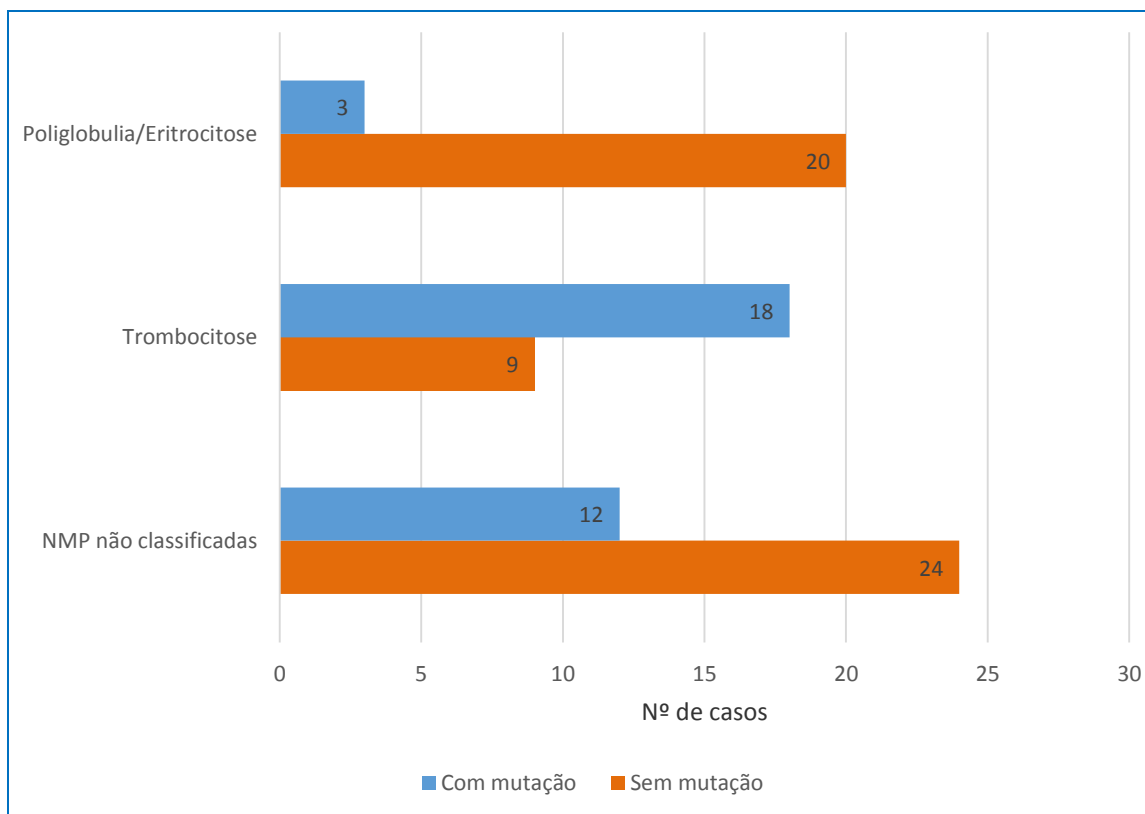


Gráfico 3 – Frequência de mutações nos doentes com poliglobulia e/ou eritrocitose, trombocitose e NMP não classificada.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A ocorrência de mutações no gene *JAK2* tem sido associada ao início e progressão das NMP (Ghoreschi *et al*, 2009). A descoberta da mutação V617F no gene *JAK2*, bem como a sua detecção numa elevada frequência nos doentes com NMP, especialmente na PV, forneceu aos clínicos um teste molecular muito importante para o diagnóstico destas patologias. A pesquisa da mutação V617F ou de mutações no exão 12 do gene *JAK2* e no exão 10 do gene *MPL*, faz parte, atualmente, da investigação diagnóstica em doentes com aumento da massa eritrocitária, com trombocitose persistente ou com fibrose medular sem causa aparente, segundo os critérios definidos pela OMS para o diagnóstico de PV, TE e MFP, respetivamente (Swerdlow *et al*, 2008; Bench *et al*, 2013). A presença de uma destas mutações confirma a natureza primária e clonal da doença, sendo por isso a sua detecção patognomónica de uma NMP (Bench *et al*, 2013).

1. CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS

A primeira associação da mutação V617F do gene *JAK2* com as NMP foi descrita em 2005 por vários grupos de investigação (Baxter *et al*, 2005, James *et al*, 2005, Kralovic *et al*, 2005 e Levine *et al*, 2005). Desde então, esta mutação tem sido pesquisada em inúmeras séries de doentes com NMP, usando uma variedade de técnicas de biologia molecular altamente sensíveis, entre as quais se destacam o AS-PCR e o HRM (Steensma, 2006).

A grande diferença entre o diagnóstico genético de alterações constitucionais e de uma neoplasia adquirida é a presença invariável de células normais nas amostras de tumores (Mason *et al*, 2011). Assim, a sensibilidade das técnicas utilizadas na detecção da mutação V617F é um fator a ter em consideração, uma vez que nas amostras dos doentes com NMP é comum a presença de uma mistura de células neoplásicas e normais na medula óssea e no sangue (Steensma, 2006). No entanto, é necessário atingir um equilíbrio, pois, se por um lado, as técnicas pouco sensíveis poderão não detetar alguns casos positivos, por outro lado, o uso de técnicas muito sensíveis poderá associar-se a falsos positivos (Rapado *et al*, 2009).

No presente estudo, a mutação V617F foi pesquisada numa série de 160 amostras de doentes com NMP recebidas no GDPN para estudo genético. Numa primeira fase, e para efeitos de diagnóstico genético, estas amostras foram analisadas seguindo a metodologia que é usada por rotina no nosso laboratório (GDPN), a técnica de AS-PCR, que tem como principais vantagens ser de baixo custo, simples de executar e ter uma sensibilidade elevada, capaz de detetar baixas quantidades de DNA mutado (1-3%) numa amostra composta maioritariamente por células normais (Baxter *et al*, 2005; Jones *et al*, 2005). No entanto, a possibilidade de ocorrência de reação cruzada entre os *primers* que amplificam os alelos normais e os mutados poderá teoricamente diminuir a especificidade desta técnica. De salientar, por outro lado, a necessidade de manipulação dos produtos de PCR para a visualização dos resultados, o que sujeita os técnicos à exposição a agentes químicos normalmente mutagénicos e aumenta o risco de contaminações em futuras reações de PCR (Reed *et al*, 2007; Mason *et al*, 2011).

Recentemente, diversos estudos validaram a técnica de HRM como um método de diagnóstico molecular para a deteção da mutação V617F, bem como para a pesquisa de mutações no exão 12 do gene *JAK2* e no exão 10 do gene *MPL* (Jones *et al*, 2008; Er *et al*, 2009; Boyd *et al*, 2010). Nestes estudos, a especificidade e a sensibilidade obtida com a técnica de HRM foi similar à obtida com outras técnicas, entre as quais o AS-PCR. Para além da sua simplicidade e do seu baixo custo, a técnica de HRM apresenta como principais vantagens a rapidez do método e a imediata observação dos resultados, sem necessidade de manipulação dos produtos de PCR. Esta técnica permite ainda a deteção de outras mutações que ocorram na mesma região e a utilização do produto de PCR para posterior análise de sequenciação.

Assim, numa segunda fase do presente estudo, a totalidade das amostras foram analisadas por HRM para a pesquisa da referida mutação V617F. Contrariamente ao verificado noutros estudos, os resultados obtidos com as técnicas de HRM e AS-PCR não foram totalmente concordantes (McClure *et al*, 2006; Er *et al*, 2009). Com efeito, o HRM, comparativamente à técnica de AS-

PCR, apresentou uma especificidade de 100% e uma sensibilidade ligeiramente inferior (98,5%). Em um dos casos (TE), a técnica de HRM não detetou a presença da referida mutação, documentada por AS-PCR. A detecção da mutação V617F no referido caso pela técnica de PCR em tempo real, permitiu-nos excluir a possibilidade de se tratar de um falso positivo da técnica de AS-PCR. Tratou-se, de facto, de uma falha de sensibilidade do HRM, que poderá ser explicada pela presença da mutação V617F em apenas 2,2% das células na amostra em causa. Com efeito, tal como foi demonstrado em diferentes estudos, o limite máximo de sensibilidade³ obtido com a técnica de HRM é de 5% (Er *et al*, 2009; Qian *et al*, 2010; Cao *et al*, 2011), o que está de acordo com os nossos achados em controlos positivos.

O facto de, nos estudos citados, não terem sido observados resultados discrepantes entre a técnica de AS-PCR e HRM, pode ser provavelmente explicado pelo facto de o número de amostras positivas para a mutação V617F estudadas por estes autores ser significativamente inferior ao obtido nesta série, com um número reduzido de TE (diagnóstico referido no nosso caso com resultado discrepante entre as duas técnicas). Ora, tal como foi observado por Lippert *et al* (2006) num estudo sobre a expressão alélica da mutação V617F, efetuado em 59 doentes com PV e em 43 doentes com TE, o nível de alelo mutado nos doentes com TE é significativamente mais baixo do que o verificado em doentes com PV. Com efeito, o nível de alelo mutado variou entre 8-98% nos doentes com PV, sendo que a grande maioria destes doentes (58) apresentava mais do que 25% de alelos mutados, enquanto o nível de alelo mutado nos doentes com TE variou entre os 3-50% (média de 20%).

Em suma, o nosso estudo permitiu-nos concluir que, embora o HRM seja uma técnica promissora para uso corrente num laboratório de Biologia Molecular, a sua sensibilidade é inferior à conseguida com a técnica de AS-PCR, o que não nos permite escolher esta técnica como método de diagnóstico para a pesquisa da mutação V617F do gene *JAK2*.

³ Sensibilidade neste contexto é definida como a percentagem mínima detectável de uma mutação na totalidade dos alelos da amostra (Bench *et al*, 2013).

Apesar da pequena amostragem em que se testou a técnica de HRM para a pesquisa de mutações no exão 12 do gene *JAK2* e no exão 10 do gene *MPL* (34 e 29 casos, respetivamente), os resultados obtidos sugerem que esta técnica é adequada ao rastreio destas mutações.

De facto, no presente estudo, o HRM permitiu a deteção de um padrão alterado em todos os casos positivos e em 3 casos normais por sequenciação, o que sugere que a técnica de HRM tem uma sensibilidade adequada. De registar apenas a presença de 3 casos positivos por HRM que não foram confirmados por sequenciação. Esta discrepância poderá traduzir uma sensibilidade insuficiente da sequenciação, uma vez que esta técnica raramente deteta mutações com representatividade alélica inferior a 10% (Steensma, 2006; Pietra *et al*, 2008; Qian *et al*, 2010). Assim, coloca-se em causa a possibilidade de as amostras em questão terem baixa quantidade de mutação. Como se compreende, a possibilidade de a discordância entre os achados por HRM e sequenciação se deverem a uma menor especificidade daquela técnica não pode ser formalmente excluída.

A aplicação do HRM como técnica de rastreio para estas mutações revelou-se vantajosa em relação à técnica de sequenciação uma vez que permite resolver de uma forma rápida e com baixo custo todos os casos sem mutação. Os casos com padrão alterado por HRM terão sempre de ser sequenciados, de forma a caracterizar a mutação encontrada para posterior análise do seu significado clínico. No entanto, não é de excluir a possibilidade de, casos com percentagens baixas de células mutadas, identificadas com padrão alterado por HRM, não serem confirmáveis por sequenciação.

Em conclusão, a técnica de HRM testada nesta série revelou-se uma opção válida para substituir a técnica tradicionalmente usada na deteção destas mutações. Para além de ser um método mais dispendioso, moroso e laborioso, a sequenciação não revelou uma sensibilidade superior ao HRM.

Assim, consideramos a técnica de HRM suficientemente segura e sensível para a implementação de um rastreio rápido das mutações do exão 12 do gene

JAK2 e do exão 10 do gene *MPL*, reduzindo de forma significativa os custos e o tempo dispendido com este estudo.

2. FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES NO GENE *JAK2* E *MPL* NAS NMP CLÁSSICAS BCR-ABL1 NEGATIVAS

A determinação da frequência da mutação V617F e das mutações no exão 12 do gene *JAK2* e no exão 10 do gene *MPL*, numa série de doentes com diagnóstico de NMP constituiu um dos objetivos deste estudo.

A frequência da mutação V617F obtida nos doentes com PV (77,4%) foi consistente com alguns estudos publicados (65-97%) (Levine *et al*, 2005; McClure *et al*, 2006). No entanto, Tefferi defende que praticamente todos os doentes com PV apresentam uma mutação no gene *JAK2*, sendo que cerca de 96% são portadores da mutação V617F e os restantes (cerca de 3%) são portadores de uma mutação no exão 12 deste gene (Tefferi, 2010). No nosso estudo, foi confirmada por sequenciação apenas uma mutação com significado clínico no exão 12 do gene *JAK2* (p.R541_E543delinsK). Esta mutação foi detetada em um dos doentes com diagnóstico de PV sem mutação V617F, o que revela uma frequência de mutações do exão 12 do gene *JAK2* nestes doentes semelhante à descrita na literatura (3,2%; 1/31) (Pietra *et al*, 2008). Relativamente aos restantes 6 casos em que não se detetou nenhuma mutação no gene *JAK2*, admitimos a possibilidade de o diagnóstico de PV não ter sido confirmado, o que, a ter-se verificado, terá contribuído para uma frequência da mutação V617F ligeiramente inferior ao esperado nestes doentes.

Relativamente à outra variante encontrada no exão 12 do gene *JAK2*, a mutação c.1641+6T>C, não foi encontrada nenhuma referência na literatura. Esta alteração ocorre numa região muito próxima do intrão 12, pelo que recorremos ao teste computacional “*splice site prediction test*” que permite prever alterações no *splicing* normal do gene, no sentido de avaliar a patogenicidade da mutação. Este teste revelou que a referida mutação poderá provocar a alteração do *splicing*

normal do exão 12 do mRNA e, conseqüentemente, levar a deleção total do exão 12 do gene *JAK2*. No entanto, esta mutação já havia sido detetada no nosso laboratório num outro doente com diagnóstico de TE (amostra não incluída neste estudo), o que nos levantou a hipótese de se tratar de uma eventual mutação germinativa, visto as mutações no exão 12 do gene *JAK2* não estarem descritas nestes pacientes. No doente em questão foi pesquisada a mutação c.1641+6T>C em sangue periférico e mucosa bucal, tendo-se verificado a presença de esta mutação em ambas as amostras, o que confirmou tratar-se de uma mutação germinativa.

O significado clínico desta mutação não está, até à data, esclarecido. Dados não publicados de um centro de investigação Francês com o qual mantemos contacto (*Centre Hospitalier Universitaire Caremeau*) apontam para uma alteração sem significado patológico.

Ainda a acrescentar que, em 3 casos com poliglobulia e/ou eritrocitose foi detetada a mutação V617F. A presença destes dois critérios nestes doentes aponta para o diagnóstico de PV.

A frequência da mutação V617F na nossa série de TE foi de 32,0%, o que está de acordo com os dados encontrados na literatura (23%-57%) (Levine *et al*, 2005; Kralovics *et al*, 2005). Por outro lado, a frequência de mutações no exão 10 do gene *MPL* descrita na literatura varia entre 3 a 4% dos doentes com TE (Tefferi, 2010). Assim, seria de esperar que na nossa série de doentes com TE (25 casos) fosse detetada uma mutação no exão 10 do gene *MPL* em pelo menos 1 caso, o que não aconteceu neste estudo. No entanto, em um dos casos de TE negativo para a mutação V617F foi detetado um padrão alterado por HRM, o qual não foi confirmado por sequenciação. Pelos motivos expostos anteriormente, não podemos excluir a possibilidade de este resultado ser devido à baixa sensibilidade da técnica de sequenciação. Na nossa opinião, nestas situações seria importante repetir o estudo por HRM e sequenciação numa nova amostra do doente, para possível confirmação do resultado.

No presente estudo, a frequência da mutação V617F foi detetada numa percentagem significativa de doentes com trombocitose (66,7%). Segundo as

normas do *British Committee for Standards in Haematology* (BCSH), a presença de uma mutação patogénica, isto é, mutação V617F ou mutações no gene *MPL*, e trombocitose, na ausência de evidência de outra neoplasia mielóide, é suficiente para o diagnóstico de TE (Bench *et al*, 2012). No entanto, a trombocitose isolada é uma característica comum a outras patologias mielóides (LMC, MFP) estando presente em cerca de 7-20% dos doentes com PV numa fase inicial da doença, como único achado clínico hematopatológico (Spivak, 2010; Kiladjian, 2012). Assim, é concebível que alguns dos doentes estudados com trombocitose e com mutação V617F se distribuam pelos grupos de doentes com PV, TE e MFP.

O reduzido número de doentes com MFP que foram incluídos neste estudo (3), não nos permite concluir sobre a frequência de mutações nos genes *JAK2* e *MPL* nestes doentes. Ainda assim, é de registar a presença da mutação W515L em um dos 3 doentes testados.

Por último, é de registar que a nossa amostra era constituída por um número significativo de doentes com NMP não classificadas (36), dos quais 12 apresentavam a mutação V617F (33,3%). O elevado número de doentes com NMP não classificados deve-se provavelmente ao facto de recebermos as amostras numa fase inicial do processo de diagnóstico, sendo que na maioria das situações não é possível a posterior confirmação do diagnóstico. A mesma situação aplica-se às amostras de doentes com indicação clínica de poliglobulia e/ou eritrocitose e trombocitose.

Os nossos dados permitem concluir que a técnica de AS-PCR é mais adequada para a pesquisa da mutação V617F, enquanto as mutações no exão 12 do gene *JAK2* e no exão 10 do gene *MPL* deverão ser pesquisadas por HRM.

Apesar da limitada informação clínica nos referidos doentes, a frequência das alterações pesquisadas nos diferentes grupos de diagnóstico são comparáveis às publicadas pelos autores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 2007;26:6724-6737.

Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-1061.

Bench AJ, White HE, Foroni L, Godfrey AL, Gerrard G, Akiki S, Awan A, Carter I, Fernández AG, Langaberr SE, Clench T, Clark J, Evans PA, Grimwade D, Schuh A, McMullin MF, Green AR, Harrison CN, Cross NCP. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *British J Hematol*. 2012;160:25-34.

Bench AJ, Baxter EJ, Green AR. Methods for detecting mutations in the human JAK2 gene. *Methods Mol Biol*. 2013;967:115-31.

Boyd EM, Bench AJ, Fernández AG, Anand S, Vaghela KJ, Beer P, Scott MA, Bareford D, Green AR, huntly B, Erber WN. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *British Journal Haematology*. 2010;149:250-257.

Brien S, Tefferi A, Valent P. Chronic myelogenous leukemia and myeloproliferative disease. *Am Society Hematol*. 2004:146-162.

Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med*. 2006;355:2452-2466.

Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA, Vassiliou GS, Milligan DW, Smith SR, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Harrison CN, Green AR. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366:1945-1953.

Cankovic M, Whiteley L, Hawley RC, Zarbo RJ, Chitale D. Clinical performance of JAK2 V617F mutation detection assays in a molecular diagnostics laboratory: evaluation of screening and quantitation methods. *Am J Clin Pathol*. 2009;132:713-721.

Cao HC, Lin J, Qian J, Yao DM, Li Y, Yang J, Chen Q, Chai HY, Xiau GF. Detection of the JAK2 mutation in myeloproliferative neoplasms by asymmetric PCR with unlabeled probe and high-resolution melt analysis. *J Clin Lab Anal*. 2011;25:300-304.

Carillo S, Henry L, Lippert E, Girodon F, Guiraud I, Richard C, Galopin FD, Cleyrat C, Jourdan E, Kralovics R, Hermouet S, Bertrand TL. A highly sensitive, reliable, and simple method for detection of JAK2 Exon 12 mutations – clinical relevance in the monitoring of polycythemia. *J Mol Diagn*. 2011;13:263-270.

- Chauffallie MLLF. Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(4):308-316.
- Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6:372-375.
- Er TK, Lin SF, Chang JG, Hsieh LL, Lin SK, Wang LH, Lin CW, Chang CS, Liu TC. Detection of the JAK2 V617F missense mutation by high resolution melting analysis and its validation. *Clinical Chimica Acta*. 2009;408:39-44.
- Fey MF. Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol*. 2007;18:i9–i13.
- Finazzi G, Barbui T. How I treat patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;109:5104-5111.
- Furgan M, Mukhi N, Lee B, Liu D. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomarker Research*. 2013;1:1-10.
- Ghoreschi K, Laurance A, O'Shea JJ. Janus Kinase in immune cell signalling. *Immunol Rev*. 2009;228:273-287.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, BCR, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36:93–99.
- Hoang T. The origin of hematopoietic cell type diversity. *Nature*. 2004;23:7188-7198.
- Hunter T. Signal transduction. *Cytokine Connections*. *Nature*. 1993;366:114–116.
- James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med*. 2005;11:546–554.
- Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Reddy EP. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes Cancer*. 2010;1:979-993.
- Jones AV, Cross NCP, White HE, Green AR, Scott LM. Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis. *Haematologica*. 2008;93:1560-1564.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106:2162-2168.

- Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood*. 2005;105:4187-4190.
- Kiladjian JJ. The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. *Hematology*. 2012;561-566.
- Kim HR, Choi HJ, Kim YK, Kim HJ, Shin JH, Suh SP, Ryang DW, Shin MG. Allelic expresion imbalance of JAK2 V617F mutation in BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms. *Plos one*. 2013;8:1-7.
- Koopmans SM, Marion AMW, Schouten HC. Myeloproliferative neoplasia: a review of clinical criteria and treatment. *Neth J Med*. 2012;70:159-167.
- Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Kralovics R. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;30:229-236.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo ST, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-1790.
- Kristinsson SY, Landgren O, Samuelsson J, Björkholm M, Goldin LR. Autoimmunity and the risk of myoproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2010;95(7):1216-1220.
- Larsson J, Karlsson S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*. 2005;24:5676–5692.
- Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;1126:2190–2198.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Benjamin L, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397.
- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Dupré NB, Skoda RC, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essencial thrombocytemia and polycythemia vera. *Blood*. 2006;108:1865-1867.
- Martínez-Avilés L, Besses C, Álvarez-Larrán A, Cervantes F, Hernández-Boluda JC, Bellosillo B. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis. *Haematologica*. 2007;92:1717-1718.
- Mason J, Akiki S, Griffiths MJ. Pitfalls in molecular diagnosis in haemato-oncology. *J Clin Pathol*. 2011;64:275–278.

Malentacchi F, Forni G, Vinci S, Orlando C. Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(12).

McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2006;20:168-171.

Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.

Olsen RJ, Tang Z, Farkas DH, Bernard DW, Zu Y, Chang CC. Detection of the JAK2 (V617F) mutation in myeloproliferative disorders by melting curve analysis using the LightCycler system. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:997-1003.

Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theodorides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L, Skoda R, Cazzola M. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F) - negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111:1686-1689.

Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3:e270.

Prchal JF, Adamson JW, Murphy S, Steinmann L, Fialkow PJ. Polycythemia vera. The in vitro response of normal and abnormal stem cell lines to erythropoietin. *J Clin Invest*. 1978;61:1044-1047.

Qian J, Lin J, Yao DM, Chen Q, Xiao GF, Ji RB, Li Y. Rapid detection of V617F mutation using high-resolution melting analysis with lighscanner platform. *Clinical Chimica Acta*. 2010;411:2097-2100.

Rapado I, Grande S, Albizua E, Ayala R, Hernández JÁ, Gallardo M, Gilsanz F, Lopez JM. High resolution melting analysis for JAK2 exon 14 and exon 12 mutations – a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *J Mol Diagn*. 2009;11:155-161.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*. 2004;117:1281-1283.

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007;8:597-608.

Registo Oncológico Nacional 2001. Porto: Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil; 2008.

Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*. 2007;26:6715–6723.

Rollison D, Howlader N, Smith M, Strom S, Merritt W, Ries L, Edwards B, List A. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*. 2008;112:45-52.

RORENO. Registo Oncológico Regional do Norte 2008. Porto: Instituto Português de Oncologia do Porto; 2013.

Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage ØX174 DNA. *Nature*. 1977;265:678-695.

Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal A, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Green AR. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356:459-468.

Smith CA, Fan G. The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Hum Pathol*. 2008;39:795-810.

Spivak JL. Narrative review: thrombocytosis, polycythemia vera, and JAK2 mutations: the phenotypic mimicry of chronic myeloproliferation. *Ann Intern Med*. 2010;152:300-306.

Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood*. 2002;100:4272-4290.

Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility. *J Mol Diagn*. 2006;8:397-411.

Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4^a Ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.

Tefferi A, Barbui T. bcr/abl-Negative, classic myeloproliferative disorders: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2005;80:1220-1232.

Tefferi A, Barbui T. Personalized management of essential thrombocythemia – application of recent evidence to clinical practice. *Leukemia*. 2013;1-4.

Tefferi A, Noel P, Hanson CA. Uses and abuses of JAK2 and MPL mutation tests in myeloproliferative neoplasms. *J Mol Diagn*. 2011;13:461-466.

Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 2010;24:1128-1138.

Tefferi A. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2012;87:285-293.

Tefferi A (a). Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2013:507-516.

Tefferi A (b). Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2013;88:142-150.

Tefferi A, Skoda R, Vardiman JW. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2009:1-11.

Tiede A, Rand JH, Budde U, Ganser A, Federici AB. How I treat the acquired von Willebrand syndrome. *Blood*. 2011;117:6777-6785.

Vannucchi AM, Guglielmelli P. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond *JAK2* and *MPL* mutations. *Haematologica*. 2008;93:972-976.

Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin*. 2009;59:171-191.

Vannucchi AM, Pieri L, Guglielmelli P. JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment. *Ther Adv Hematol*. 2011;2:21-32.

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. 2002; *Blood*;100:2292-2302.

ANEXOS

I - Dados clínicos dos doentes e respetivos resultados da análise das mutações V617F *JAK2*, do exão 12 do gene *JAK2* e do exão 10 do gene *MPL*

Doente (nº)	Idade (anos)/Sexo	Diagnóstico Provisório/Achados clínicos	Resultados das técnicas moleculares					
			V617F <i>JAK2</i>		Exão 12 <i>JAK2</i>		Exão 10 <i>MPL</i>	
			AS-PCR	HRM	HRM	Sequenciação	HRM	Sequenciação
1	57/M	TE	-	-	NR	NR	-	-
2	32/M	Poliglobulia	-	-	-	-	-	-
3	50/F	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
4	70/M	TE	-	-	NR	NR	-	-
5	76/M	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
6	57/M	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
7	69/M	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
8	89/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
9	61/M	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
10	67/M	Trombocitose	-	-	NR	NR	-	-
11	73/F	Eritrocitose	-	-	+	-	NR	NR
12	63/M	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
13	43/F	Leucocitose	-	-	-	-	NR	NR
14	89/F	TE	-	-	NR	NR	-	-
15	72/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
16	68/F	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
17	39/M	Leucocitose	-	-	-	-	NR	NR
18	80/F	Leucocitose	-	-	-	-	NR	NR
19	66/M	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
20	75/M	PV	-	-	-	-	NR	NR
21	80/F	Trombocitose	-	-	NR	NR	-	-
22	17/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
23	81/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
24	74/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
25	54/M	Poliglobulia secundária	-	-	-	-	NR	NR

(+) Presença de mutação; (-) Ausência de mutação; (FA) Falha na amplificação; (NR) Não realizado

Doente (nº)	Idade (anos)/Sexo	Diagnóstico Provisório/Achados clínicos	Resultados das técnicas moleculares					
			V617F <i>JAK2</i>		Exão 12 <i>JAK2</i>		Exão 10 <i>MPL</i>	
			AS-PCR	HRM	HRM	Sequenciação	HRM	Sequenciação
26	53/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
27	61/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
28	82/F	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
29	80/M	Eritrocitose	-	-	-	-	NR	NR
30	73/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
31	44/F	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
32	59/F	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
33	64/F	Trombocitose	-	-	NR	NR	-	-
34	75/F	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
35	75/M	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
36	69/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
37	42/F	Leucocitose	-	-	-	-	NR	NR
38	20/M	TE	-	-	NR	NR	-	-
39	77/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
40	76/M	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
41	76/F	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
42	82/F	Trombocitose	+	-	NR	NR	NR	NR
43	71/M	Poliglobulia	+	+	NR	NR	NR	NR
44	36/M	Leucocitose	-	-	-	-	NR	NR
45	75/M	Eritrocitose	-	-	-	-	NR	NR
46	82/M	Leucocitose	-	-	-	-	NR	NR
47	84/F	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
48	75/M	TE	+	+	NR	NR	NR	NR
49	52/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
50	57/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
51	80/M	Poliglobulia	+	+	NR	NR	NR	NR
52	68/F	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
53	31/F	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
54	66/M	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
55	53/F	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
56	80/M	TE	-	-	NR	NR	-	-

(+) Presença de mutação; (-) Ausência de mutação; (FA) Falha na amplificação; (NR) Não realizado

Doente (nº)	Idade (anos)/Sexo	Diagnóstico Provisório/Achados clínicos	Resultados das técnicas moleculares					
			V617F <i>JAK2</i>		Exão 12 <i>JAK2</i>		Exão 10 <i>MPL</i>	
			AS-PCR	HRM	HRM	Sequenciação	HRM	Sequenciação
57	15/M	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
58	70/F	Trombocitose	-	-	NR	NR	-	-
59	72/M	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
60	88/M	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
61	55/M	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
62	78/F	Eritrocitose	-	-	-	-	NR	NR
63	63/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
64	77/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
65	79/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
66	43/M	MFP	-	-	NR	NR	-	-
67	45/M	PV	-	-	FA	NR	NR	NR
68	90/F	TE	+	+	NR	NR	NR	NR
69	45/M	PV	-	-	-	-	NR	NR
70	62/M	Trombocitose	-	-	NR	NR	-	-
71	78/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
72	42/M	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
73	90/F	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
74	74/F	TE	+	+	NR	NR	NR	NR
75	84/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
76	39/M	NMP	-	FA	NR	NR	NR	NR
77	79/F	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
78	60/M	Eritrocitose	-	-	-	-	NR	NR
79	69/M	Trombocitose	-	-	NR	NR	-	-
80	36/M	Trombocitose	-	-	NR	NR	-	-
81	65/M	Eritrocitose	-	-	-	-	NR	NR
82	36/M	Poliglobulia secundária	-	-	FA	NR	NR	NR
83	78/F	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
84	77/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
85	79/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
86	62/M	Trombocitose	-	-	NR	NR	-	-

(+) Presença de mutação; (-) Ausência de mutação; (FA) Falha na amplificação; (NR) Não realizado

Doente (nº)	Idade (anos)/Sexo	Diagnóstico Provisório/Achados clínicos						
			V617F <i>JAK2</i>		Exão 12 <i>JAK2</i>		Exão 10 <i>MPL</i>	
			AS-PCR	HRM	HRM	Sequenciação	HRM	Sequenciação
87	68/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
88	70/F	Poliglobulia	+	+	NR	NR	NR	NR
89	73/F	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
90	65/F	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
91	29/F	TE	-	-	NR	NR	-	-
92	63/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
93	59/M	Trombocitose	+	+	NR	NR	NR	NR
94	22/F	Trombocitose	-	-	NR	NR	-	-
95	75/M	TE	-	-	NR	NR	-	-
96	41/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
97	66/F	TE	+	+	NR	NR	NR	NR
98	64/M	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
99	71/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
100	54/M	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
101	74/F	MFP	-	-	NR	NR	-	-
102	25/F	TE	-	-	NR	NR	-	-
103	2/F	TE	-	-	NR	NR	-	-
104	68/F	PV	-	-	-	-	NR	NR
105	49/M	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
106	41/M	TE	-	-	NR	NR	-	-
107	30/F	TE	-	-	NR	NR	-	-
108	80/F	TE	-	-	NR	NR	-	-
109	94/M	TE	-	-	NR	NR	-	-
110	54/M	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
111	80/F	TE	-	-	NR	NR	-	-
112	56/M	PV	-	-	+	-	NR	NR
113	78/M	MFP	-	-	NR	NR	+	+
114	36/F	TE	-	-	NR	NR	+	-
115	80/F	TE	+	+	NR	NR	NR	NR
116	49/F	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR

(+) Presença de mutação; (-) Ausência de mutação; (FA) Falha na amplificação; (NR) Não realizado

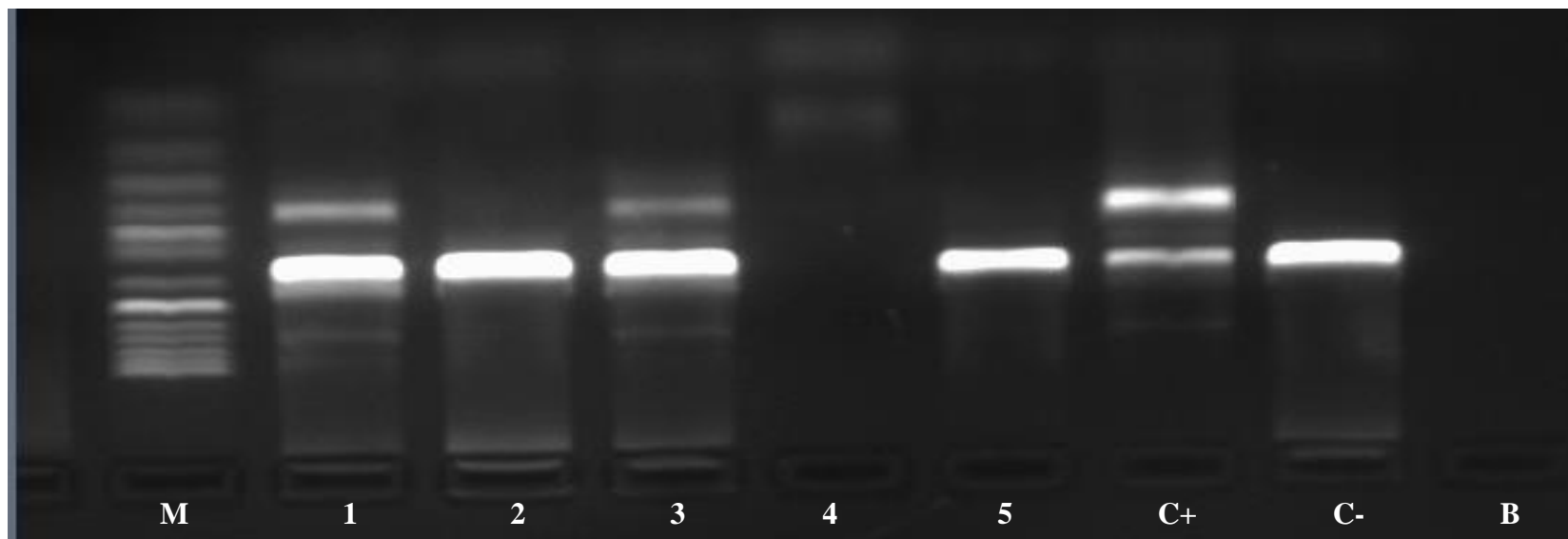
Doente (nº)	Idade (anos)/Sexo	Diagnóstico Provisório/Achados clínicos	Resultados das técnicas moleculares					
			V617F <i>JAK2</i>		Exão 12 <i>JAK2</i>		Exão 10 <i>MPL</i>	
			AS-PCR	HRM	HRM	Sequenciação	HRM	Sequenciação
117	62/M	Poliglobulia	-	-	-	-	NR	NR
118	74/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
119	42/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
120	72/F	TE	+	+	NR	NR	NR	NR
121	59/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
122	58/M	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
123	70/M	Eritrocitose	-	-	-	-	-	-
124	74/M	MFP	-	-	NR	NR	FA	NR
125	80/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
126	82/M	PV	-	-	-	-	NR	NR
127	67/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
128	57/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
129	74/F	TE	-	-	NR	NR	-	-
130	73/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
131	64/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
132	76/F	PV	+	+	NR	NR	NR	NR
133	52/F	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
134	66/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
135	78/F	TE	+	+	NR	NR	NR	NR
136	72/M	TE	+	+	NR	NR	NR	NR
137	55/M	TE	-	-	NR	NR	-	-
138	71/M	PV	-	-	-	-	NR	NR
139	77/F	PV	-	-	+	+	NR	NR
140	29/F	TE	-	-	NR	NR	FA	NR
141	78/M	Poliglobulia	-	-	+	+	NR	NR
142	46/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
143	81/F	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
144	26/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
145	50/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
146	48/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR

(+) Presença de mutação; (-) Ausência de mutação; (FA) Falha na amplificação; (NR) Não realizado

Doente (nº)	Idade (anos)/Sexo	Diagnóstico Provisório/Achados clínicos	Resultados das técnicas moleculares					
			V617F <i>JAK2</i>		Exão 12 <i>JAK2</i>		Exão 10 <i>MPL</i>	
			AS-PCR	HRM	HRM	Sequenciação	HRM	Sequenciação
147	72/M	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
148	47/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
149	39/F	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
150	48/F	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
151	59/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
152	71/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
153	41/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
154	54/M	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
155	42/F	NMP	-	-	NR	NR	NR	NR
156	64/M	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
157	53/M	NMP	+	+	NR	NR	NR	NR
158	68/M	NMP	-	FA	NR	NR	NR	NR
159	59/F	NMP	-	FA	NR	NR	NR	NR
160	64/M	NMP	-	FA	NR	NR	NR	NR

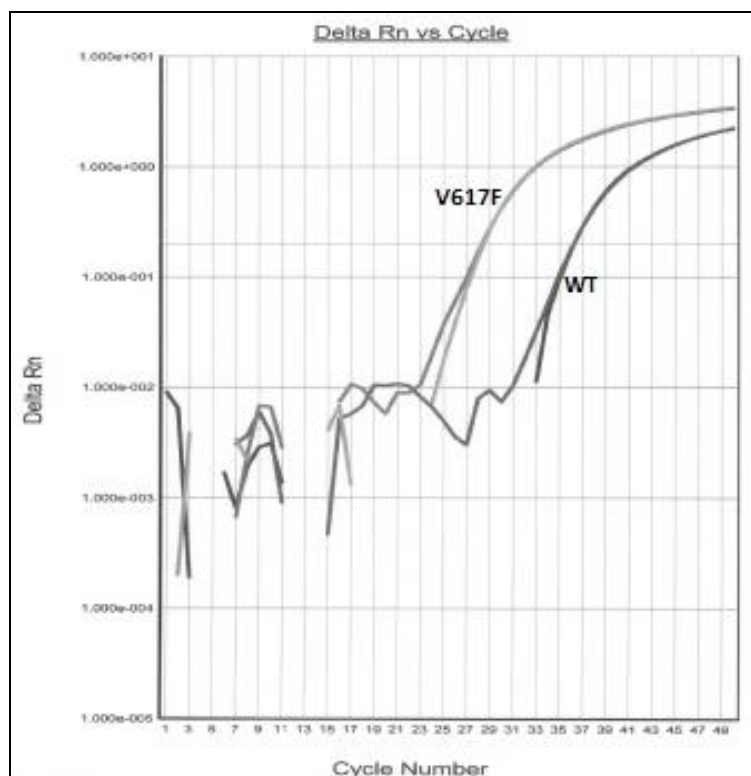
(+) Presença de mutação; (-) Ausência de mutação; (FA) Falha na amplificação; (NR) Não realizado

II – Resultado de AS-PCR em gel de agarose (exemplo)



Legenda: (M) marcador de peso molecular
(1)(3) – casos com mutação V617F
(2)(5) – casos sem mutação V617F
(4) caso sem amplificação;
(C+) controlo positivo V617F
(C-) controlo negativo V617F
(B) branco

III – Resultado do PCR em tempo real



Curvas de amplificação (duplicado) para os alelos WT e com mutação V617F

Setup Instrument Results								
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report								
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity	Mean Qty	StdDev Qty
A4	1 VF	V617F	Unknown	36.2465	0.0202	731.287	737.77	9.17
A5	1 VF	V617F	Unknown	36.2179	0.0202	744.252	737.77	9.17
A10	1 VF	WT	Unknown	28.2784	0.0899	3.42905e+004	3.30065e+004	1.81593e+003
A11	1 VF	WT	Unknown	28.4055	0.0899	3.17224e+004	3.30065e+004	1.81593e+003

Resultado do PCR em tempo real
Amostra 1 – Doente 42